

3 Ergebnisse

3.1 Westernblots zur Detektion der PLA₂

Zunächst galt es, die verschiedenen Phospholipasen in PMN mit Hilfe des Westernblots zu bestimmen. Es wurde grundsätzlich davon ausgegangen, daß die Gruppen IVa cPLA₂, VIa iPLA₂ und IIa sPLA₂ in diesen Zellen vorhanden sind, da sie in ähnlichen Zellen nachgewiesen wurden.

3.1.1 Detektion der Gruppe IVa cPLA₂

Die verwendeten cPLA₂ –Antikörper wurden uns freundlicherweise von Frau Dr. L. Marshall (Department of Immunopharmacology, King of Prussia, PA, USA) zur Verfügung gestellt. Die PMN wurden isoliert, mit 1,2 mM CaCl₂ und 1,0 mM MgCl₂ inkubiert und eine Probe 5 Minuten mit 100 nM fMLP stimuliert. Durch Lysepuffer und Zentrifugieren wurde die Reaktion gestoppt und die Enzyme mittels Elektrophorese mit anschließendem Elektrobplot bestimmt. Als Kontrolle dienten A431 Zellen, von denen bekannt ist, daß sie die cPLA₂, nicht aber die iPLA₂ besitzen [153].

Die Gruppe der IVa kalziumabhängigen cPLA₂ lief bei exakt 85 kDa (siehe Abbildung 3.1).

3.1.2 Detektion der Gruppe VIa iPLA₂

Die iPLA₂ –Antikörper konnten von der Firma Cayman erworben werden. Der Versuchsaufbau entsprach dem des Westernblots zur Detektion der cPLA₂.

Die Gruppe der VIa iPLA₂ wurde bei einem leicht erhöhten Wert von ca. 85–90 kDa detektiert. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Dennis et al.. Diese arbeitete in Monozytensystemen und hierbei war der gleiche Effekt sichtbar [7].

3.1.3 Zusammenfassung

Es konnte der Nachweis erbracht werden, daß die Gruppen IVa cPLA₂ und VIa iPLA₂ in humanen PMN vorhanden sind. Für die Gruppe der IIa sPLA₂ waren keine Antikörper erhältlich.

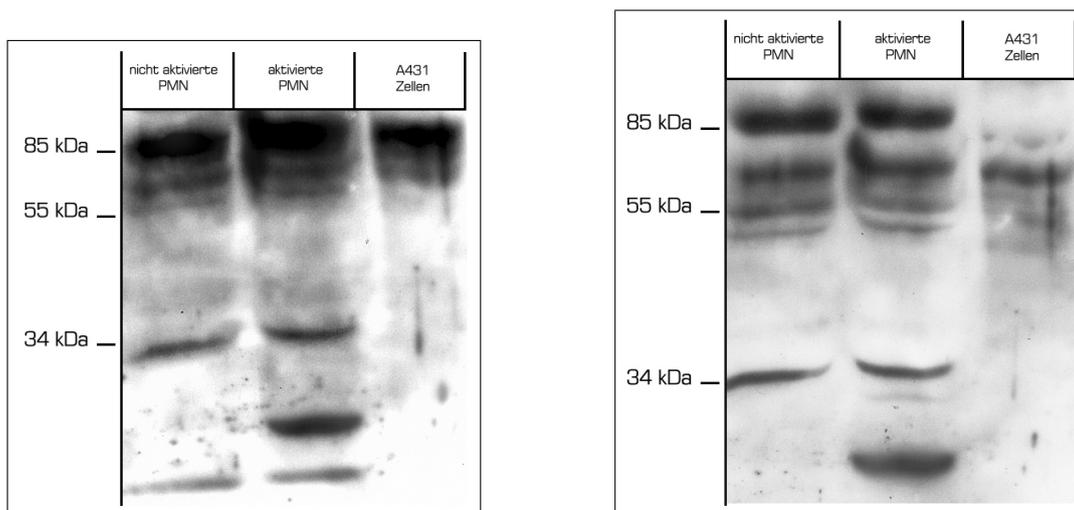


Abbildung 3.1: Westernblots zur Detektion der cPLA₂ (linke Abbildung) und zur Detektion der Gruppe VIa iPLA₂ in humanen PMN (rechte Abbildung), siehe Kapitel 3.1.

Der Nachweis blieb hier aus.

3.2 Die Effekte der PLA₂-Inhibitoren auf die AA-Freisetzung

Die PLA₂ und die PLD sind die bedeutendsten Mediatoren für die agonist-induzierte Freisetzung der AA in den meisten Zelltypen [46]. Die Aktivierung der einzelnen Enzyme ist abhängig von dem jeweiligen Zellstimulator. In dieser Arbeit wurde vorwiegend fMLP als Zellaktivator verwendet. Mit Hilfe von verschiedenen Inhibitoren wurde die AA-Freisetzung untersucht.

Zur direkten Hemmung der Phospholipasen standen folgende Inhibitoren zur Verfügung:

- BEL hemmt von den PLA₂ selektiv die iPLA₂, zudem hemmt BEL die PAP [7].
- Propranolol ist ein Hemmstoff der PAP [121].
- MAFP ist ein Inhibitor der Gruppen IVa cPLA₂ und VIa iPLA₂ [100].
- SB 203347 wurde als Inhibitor der 14 kDa sPLA₂ [174] verwendet.
- 12-epi-SLD ist bekannt als Inhibitor der Gruppe IIa sPLA₂ [13].

Bei diesen Versuchsreihen wurden die PMN, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, aus Vollblut isoliert, auf eine Konzentration von $5 \cdot 10^6$ PMN/ml eingestellt, mit CaCl₂/MgCl₂ und den entsprechenden Inhibitoren für 5 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert und anschlie-

ßend mit 100 nM fMLP aktiviert. Die Reaktion wurde nach 5 Minuten mit 3,8 ml Methanol/Chloroform/Essigsäure (2:1:0,04, Vol./Vol./Vol.) gestoppt. Es folgte eine Extraktion nach Bligh und Dyer [22].

Die zugesetzte AA (1,4 µM, spezifische Aktivität 50 mCi/mmol) wurde zu 71,5 % ± 2,54 % (n = 8) aufgenommen. Die freie AA mit einer Restaktivität von 28,5 % ± 2,54 % wurde entfernt.

Die Fraktionen wurden mittels Radiodünnschichtchromatographie getrennt und ihre Radioaktivität mit Hilfe der Flüssigkeitsszintillationsmessung bestimmt.

3.2.1 MAFP, ein Inhibitor der iPLA₂ und cPLA₂

MAFP ist ein irreversibler Hemmer der Phospholipasen, die Serin enthalten. Es kann dabei nicht zwischen iPLA₂ und cPLA₂ unterschieden werden [100]. Zuerst wurde in einem Vorversuch die Konzentration von MAFP mit der höchsten inhibitorischen Wirkung auf die AA-Produktion ermittelt. Dazu wurde folgender Versuchsaufbau gewählt:

- Kontrollgruppe ohne fMLP-Aktivierung,
- Kontrollgruppe mit fMLP-Aktivierung,
- Kontrollgruppe mit 5 µM MAFP ohne fMLP-Aktivierung,
- Zellen mit 0,5 µM MAFP mit fMLP-Aktivierung,
- Zellen mit 1 µM MAFP mit fMLP-Aktivierung,
- Zellen mit 5 µM MAFP mit fMLP-Aktivierung,
- Zellen mit 10 µM MAFP mit fMLP-Aktivierung.

Die Abbildung 3.2 zeigt die Ergebnisse dieses Vorversuches.

Deutlich wurde, daß MAFP in der Konzentration von 5 µM die stärkste Inhibition aufweist. Eine weitere Steigerung der Konzentration verstärkte die Inhibition nicht. Nachweisbar war zusätzlich, daß der Inhibitor in dieser Konzentration keine aktivierende Wirkung auf die Zellen hatte: die Zellen, die mit 10 µM MAFP versetzt wurden, ohne anschließend mit fMLP stimuliert worden zu sein, wiesen die gleiche Menge an AA auf, wie Zellen ohne den Zusatz von MAFP.

Als nächster Schritt wurde die maximale Inhibition der AA-Produktion durch MAFP an mehreren Tagen mit PMN unterschiedlicher Spender ermittelt. Dazu wurden die PMN, wie oben beschrieben, mit dem Inhibitor versetzt und anschließend mit fMLP stimuliert. Wie im Vorversuch ermittelt, wurde mit einer Konzentration des MAFP von 5 µM gearbeitet.

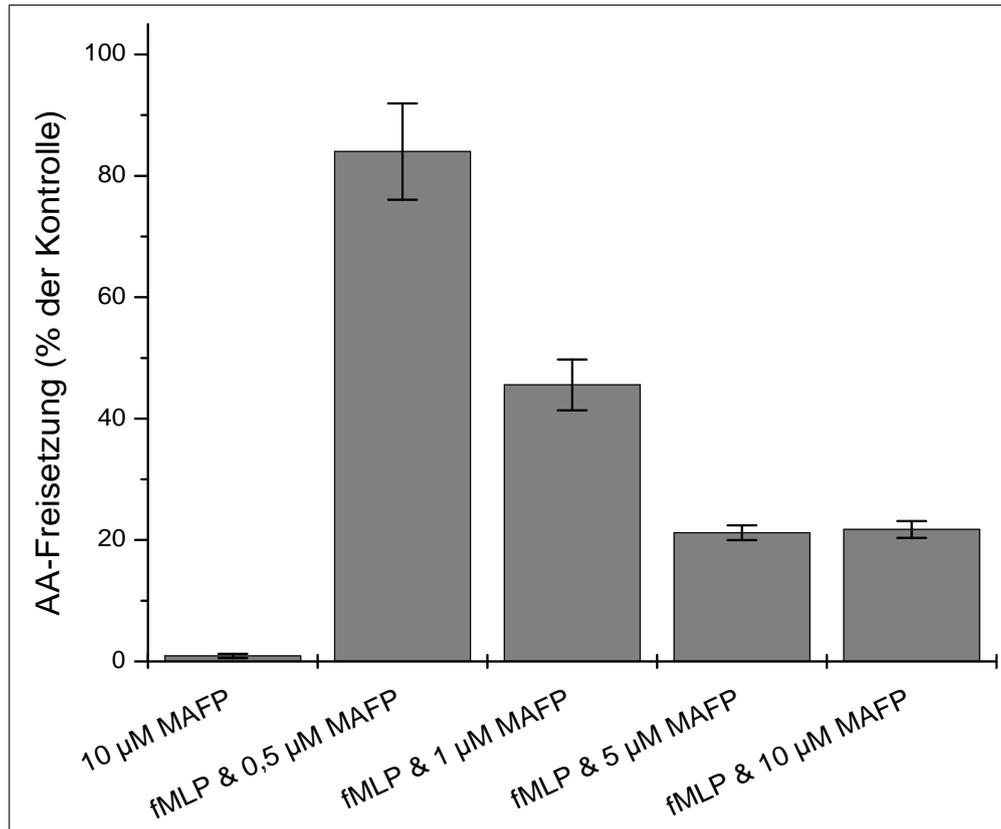


Abbildung 3.2: Vorversuch zur Ermittlung der MAFP-Konzentration mit der höchsten inhibitorischen Wirkung auf die AA-Produktion in PMN nach Stimulierung mit 100 nM fMLP. Die PMN wurden mit verschiedenen Konzentrationen von MAFP vorinkubiert, es folgte die Stimulierung mit 100 nM fMLP und die Bestimmung der cpm-Werte, wie in Kapitel 2.2 beschrieben. Die Werte wurden in Prozent der Kontrolle angegeben. Definition der Kontrolle als Differenz der Menge der nach 5 Minuten gebildeten AA in An- und Abwesenheit von fMLP. Die Kontrollwerte ohne MAFP Vorinkubation betragen $406 \pm 43 \Delta$ cpm. Die Angaben erfolgten in Mittelwert \pm SD, $n = 4$ (siehe Kapitel 3.2.1).

Bei den unterschiedlichen Spendern konnte eine Inhibition von $84,4 \pm 3,8 \%$ ($n = 4$) ermittelt werden. Die Kontrollwerte ohne MAFP-Zugabe betragen $513 \pm 76 \Delta$ cpm.

3.2.2 BEL, ein Inhibitor der Gruppe VIa iPLA₂ und PAP

BEL ist ein irreversibler Hemmstoff der iPLA₂. Es zeigt eine hohe Selektivität in der Hemmung der iPLA₂ gegenüber cPLA₂ [11]. BEL ist auch als Inhibitor der Mg²⁺-abhängigen Phosphohydrolase der PA bekannt [10].

Zunächst wurde die Konzentration mit dem maximalen Effekt auf die Inhibition der AA ermittelt. Verwendete BEL-Konzentrationen waren 1, 2, 5 und 10 μ M. Die Zellen wurden mit BEL und CaCl₂/MgCl₂ inkubiert und mit 100 nM fMLP stimuliert. BEL hatte in der Konzentration von 5 μ M den größten Effekt, der sich durch weitere Steigerung der Konzentration nicht verstärken ließ. Nachweisbar war zusätzlich, daß der Inhibitor in dieser Konzentration keine aktivierende Wirkung auf die Zellen hatte.

In der nachfolgenden Versuchsreihe wurde BEL in einer Konzentration von 5 μ M benutzt. Nach Inkubation der Zellen mit dem Inhibitor und CaCl₂/MgCl₂ und anschließender Aktivierung mit 100 nM fMLP wurde die maximale AA-Inhibition in PMN von sechs Spendern ermittelt. Die AA-Freisetzung in den Zellen wurde zu $33,6 \pm 2,8 \%$ gehemmt (siehe Abbildung 3.3).

3.2.3 Propranolol, ein PAP-Inhibitor

Der β -Adrenorezeptorantagonist Propranolol greift in den PLD-Weg ein, indem er die Mg²⁺-abhängige Phosphohydrolase der PA blockiert [121]. In der Versuchsreihe wurden die Zellen 5 Minuten mit 100 μ M Propranolol inkubiert, mit 100 nM fMLP stimuliert und die Freisetzung der AA bestimmt (siehe Abbildung 3.4).

Die Hemmung der AA-Freisetzung entsprach mit $36,8 \pm 4,3 \%$ etwa der Inhibition, die mit BEL erreicht wurde.

3.2.4 12-epi-SLD und SB 203347, zwei Typ II PLA₂ Inhibitoren

12-epi-SLD ist ein Naturprodukt aus dem Meer, das aus Schwämmen gewonnen wird (Cacospongia Mollior). Die Wirkung in PMN wurde unter anderen Versuchsbedingungen von Marshall et al. untersucht [107]. Es hemmte in den beschriebenen Versuchen die 14 kDa sPLA₂ stark, während die Gruppe IVa cPLA₂ nur schwach inhibiert wurde. SB 203347 ist ein Inhibitor der 14 kDa sPLA₂. In der folgenden Versuchsreihe wurde 12-epi-SLD in einer

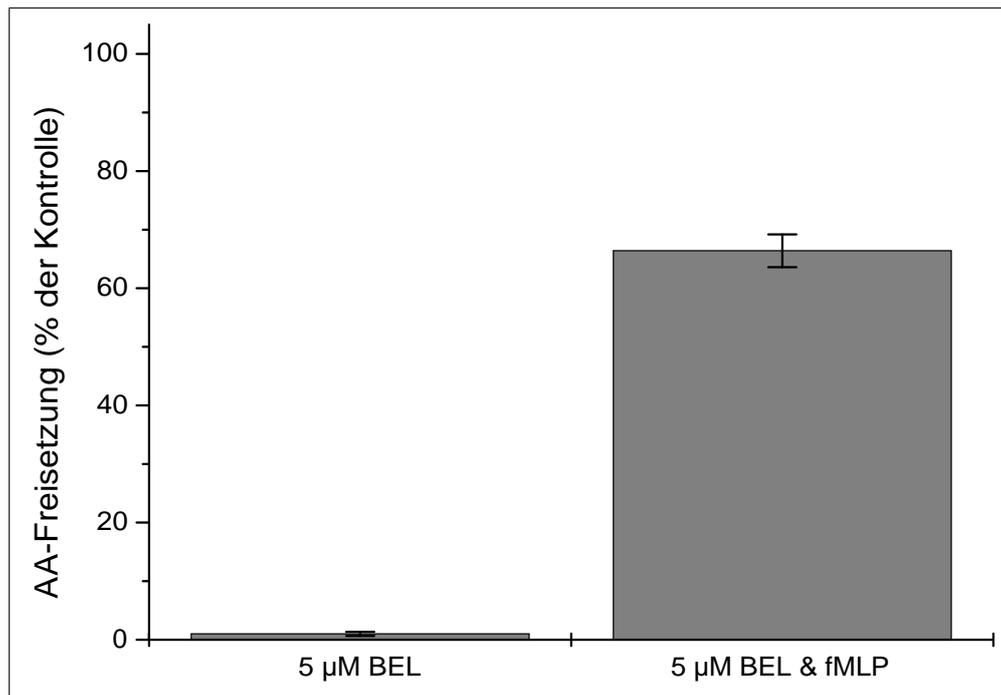


Abbildung 3.3: Effekt von BEL auf die Freisetzung von AA in humanen PMN nach Stimulierung mit 100 nM fMLP. Die PMN wurden mit 5 μ M BEL vorinkubiert, es folgte die Aktivierung mit 100 nM fMLP und die Bestimmung der cpm-Werte, wie in Kapitel 2.2 beschrieben. Die Werte wurden in Prozent der Kontrolle angegeben. Definition der Kontrolle als Differenz der Menge der nach 5 Minuten gebildeten AA in An- und Abwesenheit von fMLP. Die Kontrollwerte ohne Vorinkubation mit BEL betragen $362 \pm 43 \Delta$ cpm. Die Angaben erfolgten in Mittelwert \pm SD, n = 6 (siehe Kapitel 3.2.2).

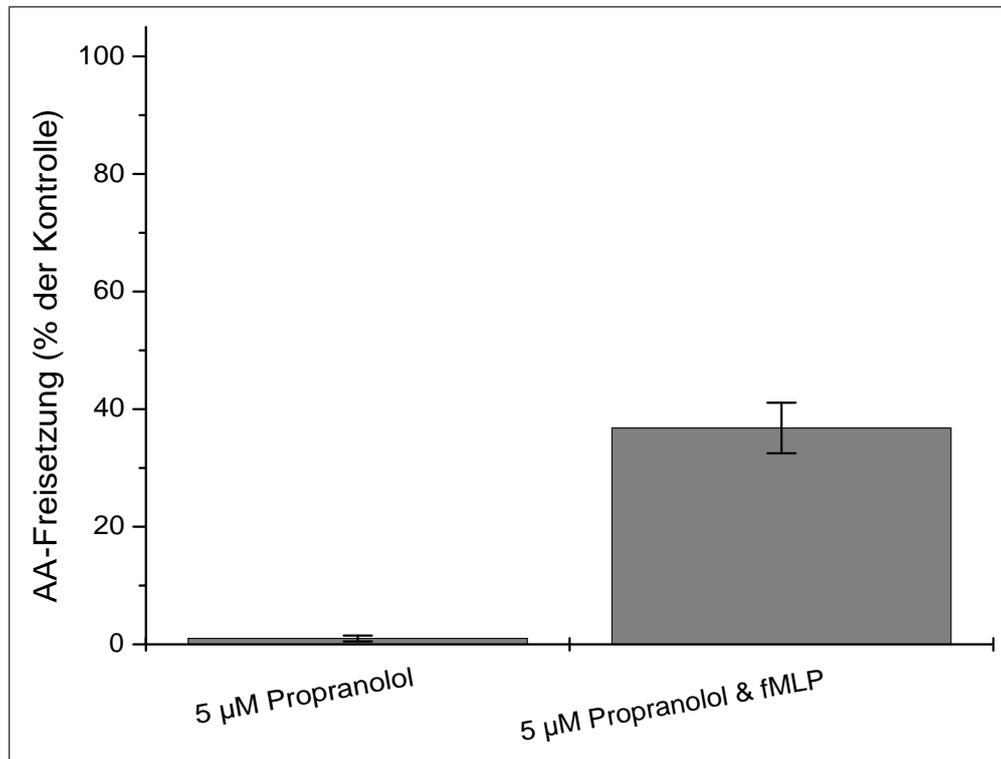


Abbildung 3.4: Die Wirkung von Propranolol auf die Freisetzung von AA nach Stimulierung mit 100 nM fMLP in PMN. Die PMN wurden mit 100 µM Propranolol vorinkubiert, es folgte die Aktivierung mit 100 nM fMLP und die Bestimmung der cpm-Werte, wie in Kapitel 2.2 beschrieben. Die Werte wurden in Prozent der Kontrolle angegeben. Definition der Kontrolle als Differenz der Menge der nach 5 Minuten gebildeten AA in An- und Abwesenheit von fMLP. Die Kontrollwerte ohne Vorinkubation mit Propranolol betragen $367 \pm 54 \Delta$ cpm. Die Angaben erfolgten in Mittelwert \pm SD, n = 3 (siehe Kapitel 3.2.3).

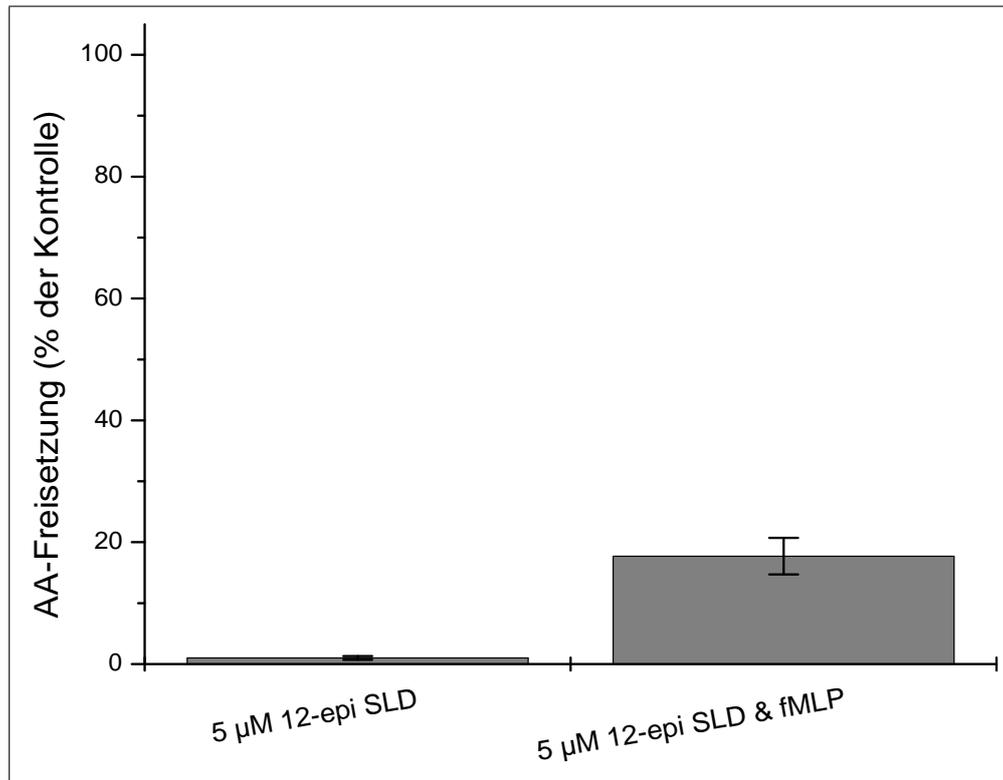


Abbildung 3.5: Einfluß von 5 µM 12-epi-SLD auf die Freisetzung von AA in PMN. Die PMN wurden mit 5 µM 12-epi-SLD vorinkubiert, es folgte die Aktivierung mit 100 nM fMLP und die Bestimmung der cpm-Werte, wie in 2.2 beschrieben. Die Werte wurden in Prozent der Kontrolle angegeben. Definition der Kontrolle als Differenz der Menge der nach 5 Minuten gebildeten AA in An- und Abwesenheit von fMLP. Die Kontrollwerte ohne Vorinkubation mit 12-epi-SLD betragen $385 \pm 34 \Delta$ cpm. Die Angaben erfolgten in Mittelwert \pm SD, $n = 4$ (siehe Kapitel 3.2.4).

Konzentration von 5 µM verwendet, SB 203347 bis zu einer Konzentration von 10 µM. Die Versuche wurden, wie in Kapitel 3.5 beschrieben, durchgeführt.

Es zeigte sich, daß 12-epi-SLD einen großen Effekt auf die AA-Freisetzung hatte, die Inhibition betrug in vier unabhängigen Versuchen bei einer Konzentration von 5 µM $82,3 \pm 3,0$ %. Allerdings sind diese Ergebnisse vor dem Hintergrund zu betrachten, daß der Inhibitor zusätzlich einen großen Einfluß auf das $[Ca^{2+}]_i$ zeigte (siehe Kapitel 3.5.5).

SB 203347 hatte keinen Effekt auf fMLP-stimulierte PMN. In drei unabhängigen Versuchen betragen die Werte $104,5 \pm 8,7$ % der Kontrolle. Dies steht im Einklang mit anderen Autoren [174]. Im Gegensatz dazu steht die starke Inhibition der AA-Freisetzung in PMN nach Ca^{2+} -Ionophore A23187-Aktivierung [108].

3.2.5 Zusammenfassung

Die verwendeten Inhibitoren des Phospholipidstoffwechsels zeigen eine unterschiedliche Inhibition der AA-Freisetzung. Eine Übersicht wird in Tabelle 3.1 gegeben.

Inhibitor	Konzentration	Wirkung auf	AA-Freisetzung (% der Kontrolle)
MAFP	5 μ M	cPLA ₂ , iPLA ₂	15,6 \pm 3,8(4)
BEL	5 μ M	iPLA ₂ , PAP	66,4 \pm 2,8(6)
Propranolol	5 μ M	PAP	63,2 \pm 4,3(3)
SB 203347	10 μ M	sPLA ₂	104,5 \pm 8,7(3)
12-epi-SLD	5 μ M	sPLA ₂	17,7 \pm 3,0(4)

Tabelle 3.1: Effekt verschiedener Inhibitoren des Phospholipidstoffwechsels auf die Freisetzung von AA in fMLP-stimulierten PMN. Die Werte wurden in Prozent der Kontrolle angegeben. Definition der Kontrolle als Differenz der Menge der nach 5 Minuten gebildeten AA in An- und Abwesenheit von fMLP. Die Angaben erfolgten in Mittelwert \pm SD, die Zahl der Versuche ist in Klammern angegeben (siehe Kapitel 3.2).

3.3 Die zeitabhängige AA-Freisetzung in PMN

Zur Untersuchung der zeitabhängigen AA-Freisetzung wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, aus Citratblut isoliert, auf eine Konzentration von $5 \cdot 10^6$ PMN/ml eingestellt, mit CaCl₂/MgCl₂ für 5 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert und anschließend mit 100 nM fMLP aktiviert. Die Reaktion der einzelnen Fraktionen wurde nach 5–300 Sekunden gestoppt.

Die Abbildung 3.6 zeigt die Kinetik dieser Versuchsreihe. Bei der Auswertung konnte eine zeitabhängige Freisetzung der AA festgestellt werden. Angedeutet war ein biphasischer Verlauf. Zunächst war ein kleiner Anstieg nach 15–20 Sekunden sichtbar, dem ein größerer Anstieg nach 2 Minuten folgte.

In den nachfolgenden Versuchen wurden die PMN mit 5 μ M MAFP oder mit 5 μ M BEL vorinkubiert, dann erfolgte die Aktivierung mit 100 nM fMLP. Es fiel auf, daß bei Verwendung von MAFP die AA-Freisetzung biphasisch verlief. Einem kleinen Anstieg nach 15 Sekunden folgt ein größerer nach 3 Minuten (siehe Abbildung 3.7). Bei der Benutzung von BEL zeigte sich ein langsamer Anstieg der AA-Freisetzung. Ein biphasischer Verlauf war nicht sichtbar (siehe Abbildung 3.8).

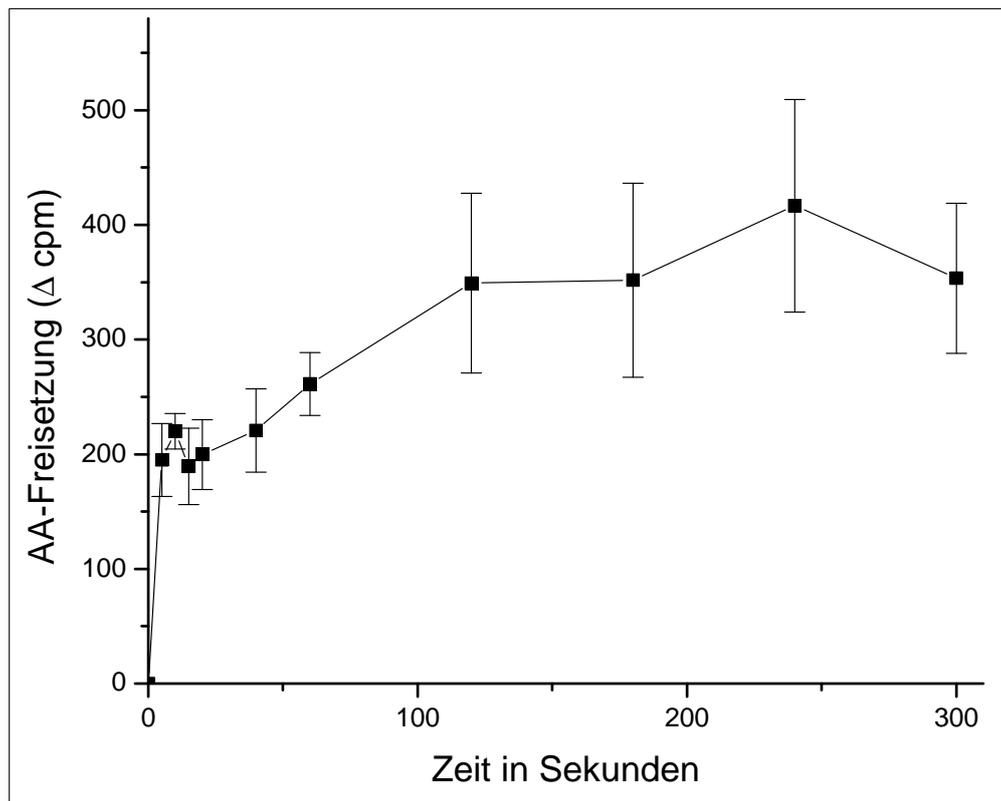


Abbildung 3.6: Versuch zur zeitabhängigen Freisetzung von AA in PMN nach Stimulierung mit 100 nM fMLP. Die Reaktion der einzelnen Fraktionen wurde nach 5–300 Sekunden gestoppt. Die Angaben erfolgten in Mittelwert \pm SD, n = 3 (siehe Kapitel 3.3).

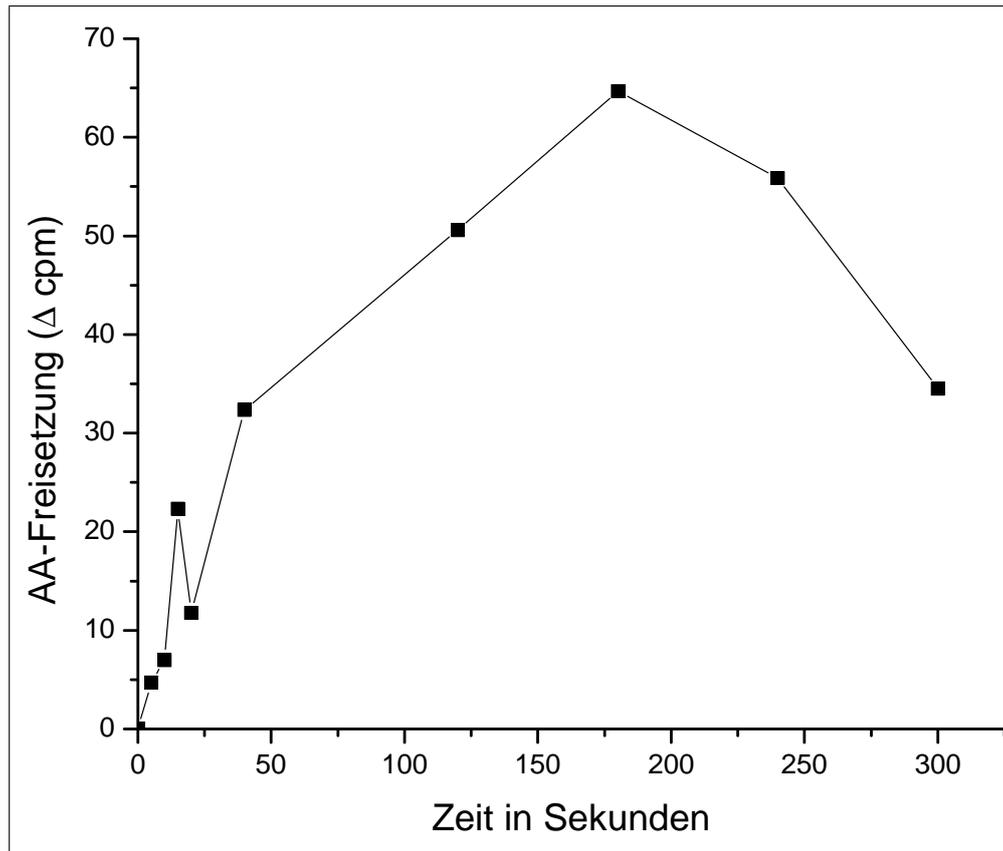


Abbildung 3.7: Zeitkurve der MAFP resistenten AA-Freisetzung. Die PMN wurden mit $5 \mu\text{M}$ MAFP vorinkubiert, dann erfolgte die Aktivierung mit 100 nM fMLP. Die Reaktion der einzelnen Fraktionen wurde nach 5–300 Sekunden gestoppt. Gezeigt ist ein repräsentativer Verlauf bei zwei durchgeführten Versuchen (siehe Kapitel 3.3).

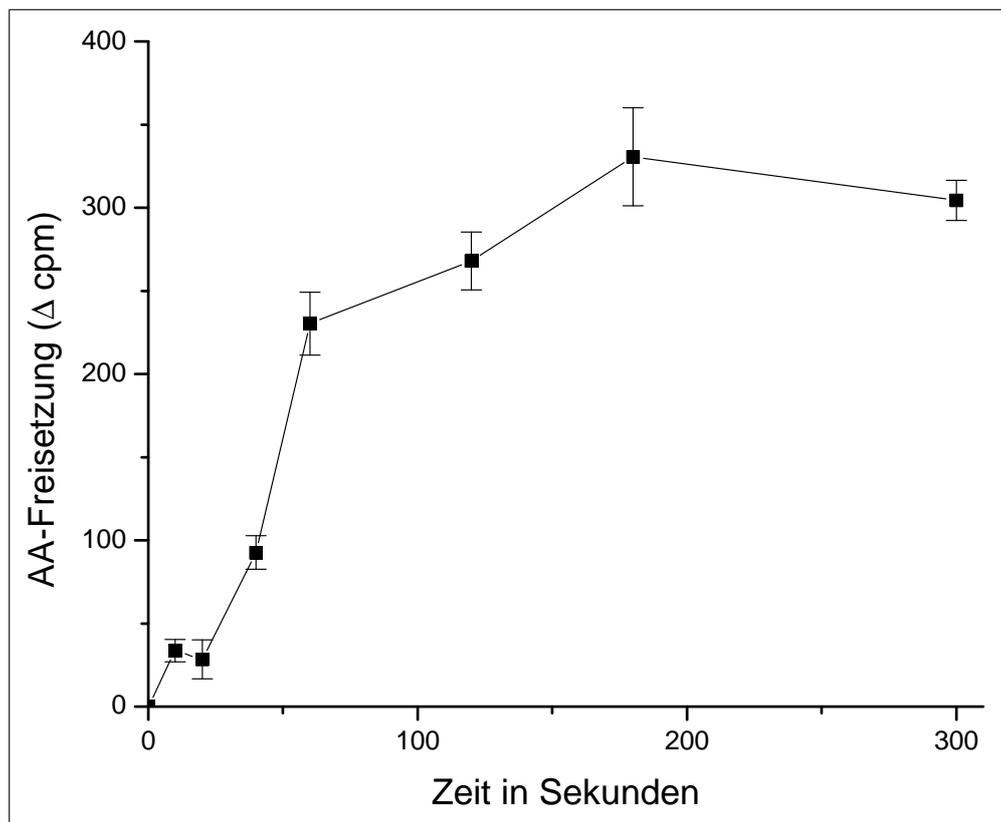


Abbildung 3.8: Zeitkurve der BEL resistenten AA-Freisetzung. Die PMN wurden mit 5 μM BEL vorinkubiert, dann erfolgte die Aktivierung mit 100 nM fMLP. Die Reaktion der einzelnen Fraktionen wurde nach 5–300 Sekunden gestoppt. Die Angaben erfolgen in Mittelwert \pm SD, $n = 3$ (siehe Kapitel 3.3).

3.4 Die Bildung von 5-LOX Produkten in PMN

In diesen Versuchsreihen wurde untersucht, welche Faktoren einen Einfluß auf die Synthese der 5-LOX-Produkte in PMN spielen. Die Untersuchungen erfolgten mittels zweier unabhängiger Methoden. Zum einen durch Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung der gesamten 5-LOX Produkte, zum anderen mit ELISA zur spezifischen Bestimmung des LTB₄.

3.4.1 Der Einfluß von AA auf die 5-LOX

Für die Bestimmung der gesamten 5-LOX Produkte wurden die Zellen mit ¹⁴C-AA vorinkubiert, zur Beseitigung der freien Säure mit Serumalbumin enthaltendem Medium inkubiert und in zwei Fraktionen geteilt, von denen eine mit fMLP stimuliert, die andere als Kontrollgruppe nicht aktiviert wurde. Die Lipide wurden, wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, extrahiert. Die Verteilung der Radioaktivität nach fMLP-Stimulierung ist in Tabelle 3.2 wiedergegeben.

	Gesamtaktivität in % ± SD
polare Lipide	18,41±5,38
LTB ₄ + Isomere	0,866±0,36
5-HETE	0,506±0,03
AA	4,08±0,75
Triacylglycerine	76,585±6,78

Tabelle 3.2: Verteilung der ¹⁴C-Gesamtaktivität auf die untersuchten Gruppen nach fünfminütiger fMLP-Stimulierung, n = 6 (siehe Kapitel 3.4.1).

Der größte Teil der ¹⁴C-AA wurde in die Triacylglycerine eingebaut und nicht durch die fMLP-Stimulierung beeinflusst. In der Gruppe der verschiedenen Phospholipide wurden die Fraktionen der PC und PS/PI am höchsten markiert, während die PE nur schwach markiert waren.

Durch Aktivierung mit fMLP konnte an Phospholipide gebundene AA mobilisiert werden. Die AA-Fraktion machte 4 % der Radioaktivität aus, während in den Fraktionen der 5-LOX-Produkte ca. 65 % weniger Radioaktivität vorhanden war.

3.4.2 Der Einfluß des fMLP auf die 5-LOX Aktivität

Die Bestimmungen der 5-LOX-Aktivität in humanen PMN nach fMLP Stimulierung ergaben unterschiedliche Ergebnisse. Während es bei allen Versuchen zu einem Anstieg der AA kam, war der Anstieg der 5-LOX-Produkte nicht konstant: Bei einigen Versuchen konnte kein

Anstieg der 5-LOX Produkte beobachtet werden, bei anderen ein Anstieg auf 300 % des Basiswertes (siehe Abbildung 3.9).

3.4.3 Vorbehandlung der PMN mit Staurosporin und Diphenyliodonium

Staurosporin ist ein PKC Inhibitor, der dadurch einen indirekten Einfluß auf die NADPH-Oxidase besitzt [120]. Die Vorbehandlung der Zellen mit Staurosporin ($0,3 \mu\text{M}$) führte sowohl zu einem Anstieg der AA, als auch zu einem Anstieg der 5-LOX-Produkte: Nach Aktivierung mit fMLP wurden $112 \pm 3 \%$ der basalen 5-LOX-Konzentration, nach Vorinkubation mit Staurosporin und anschließender Aktivierung mit fMLP $133,3 \pm 5 \%$ der basalen 5-LOX-Konzentration gemessen (siehe Abbildung 3.10).

In der nächsten Versuchsreihe wurde Diphenyliodonium (DPI) verwendet, ein Antagonist der mitochondrialen NADPH-Dehydrogenase und Inhibitor des „Respiratory Burst“ [126, 102].

Die Zellen wurden 5 Minuten mit DPI in verschiedenen Konzentrationen und $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$ inkubiert und anschließend mit fMLP stimuliert. In drei unabhängigen Versuchen ließ sich bei Steigerung der Konzentrationen des DPI ein Anstieg der 5-LOX-Metabolite erreichen (siehe Abbildung 3.11).

3.4.4 Einfluß von MAFP auf die 5-LOX-Aktivität

MAFP, ein Inhibitor der Gruppen IVa cPLA₂ und VIa iPLA₂, hemmt die AA-Freisetzung in PMN nach fMLP-Stimulierung zu $84,4 \pm 3,8 \%$ (siehe Kapitel 3.2.1).

In diesem Versuch wurde der Einfluß des MAFP auf die 5-LOX in PMN untersucht.

Die Zellen wurden 5 Minuten mit MAFP und 300 nM Staurosporin vorinkubiert, dann mit 100 nM fMLP aktiviert. In Vorversuchen wurde die Konzentration bestimmt, durch die die größte Inhibition erlangt wurde. Diese lag wie auch bei den Versuchen zur Bestimmung der AA-Freisetzung bei $5 \mu\text{M}$. Durch weitere Konzentrationssteigerungen ließ sich der Effekt nicht erhöhen.

Die Kontrollwerte der 5-LOX-Produkte betragen nach fMLP-Aktivierung ohne MAFP Vorinkubation $220 \pm 18,8 \Delta \text{cpm}$. Die gemessenen 5-LOX-Produkte wurden durch Vorinkubation der Zellen mit $5 \mu\text{M}$ MAFP zu $47,12 \pm 4,03 \%$ (Mittelwert \pm SD) gehemmt, $n = 3$.

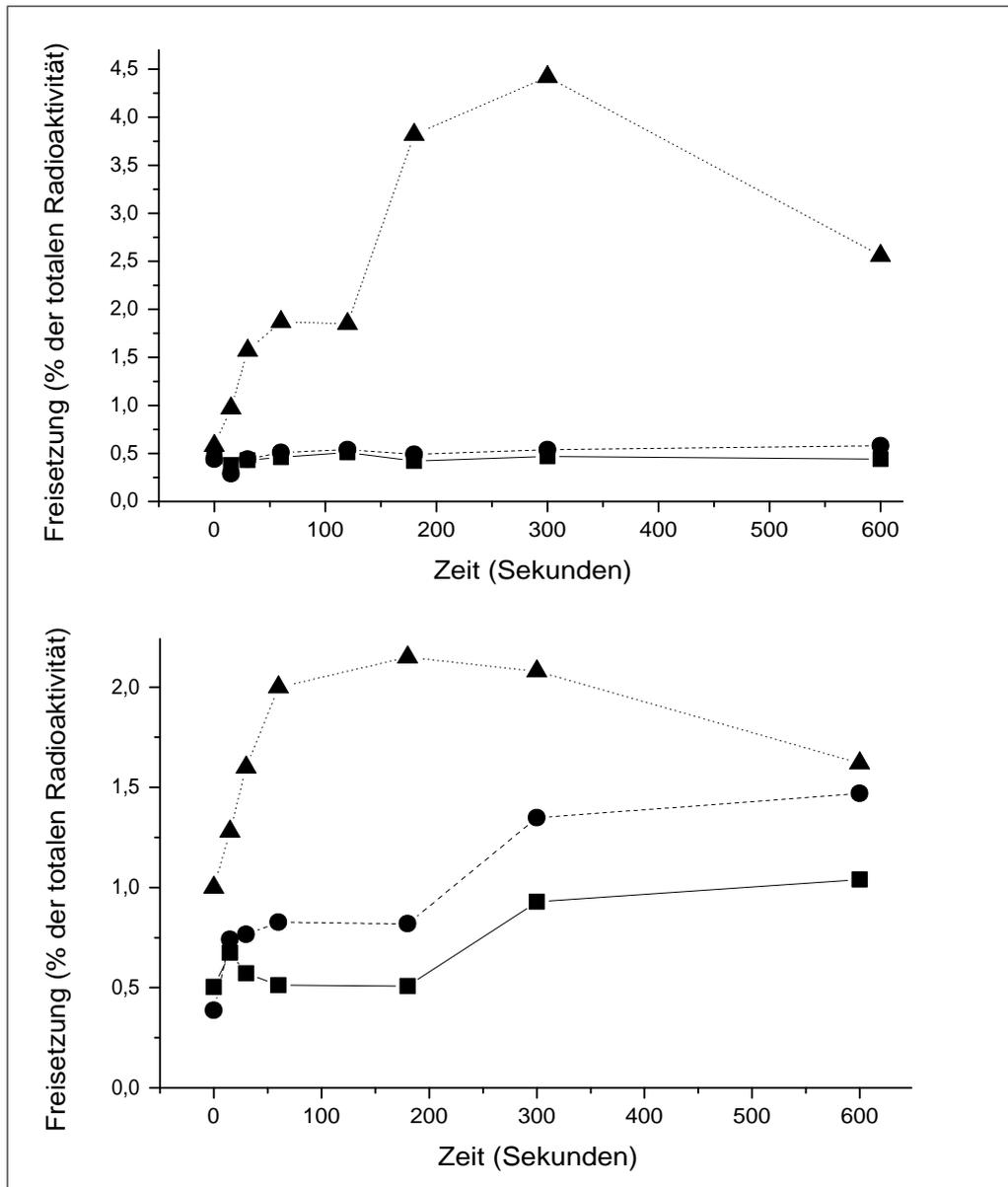


Abbildung 3.9: Variation der 5-LOX-Aktivität in fMLP-stimulierten PMN. Die obere Abbildung zeigt ein Beispiel für eine fehlende Bildung von Produkten des 5-LOX-Weges, während in der unteren Abbildung eine positive Reaktion auf die fMLP-Aktivierung zu sehen ist. Die Versuche wurden jeweils zweimal durchgeführt, gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Versuch, Dreiecke= AA, Kreise= 5-HETE, Quadrate= LTB₄. In Versuch A wurde nach 5 Minuten eine LTB₄-Produktion von 120 cpm, eine 5-HETE-Produktion von 137 cpm gemessen. Der cpm-Wert der AA betrug 426,5. In Versuch B wurde nach 5 Minuten eine LTB₄-Produktion von 174,5 cpm, eine 5-HETE-Produktion von 198,4 cpm und eine AA-Freisetzung von 402,5 cpm gemessen. Um die gesamte Verteilung der ¹⁴C-Gesamtaktivität in PMN nach fMLP Stimulierung zu berücksichtigen, erfolgten die Angaben in % der totalen Radioaktivität (siehe Kapitel 3.4.2).

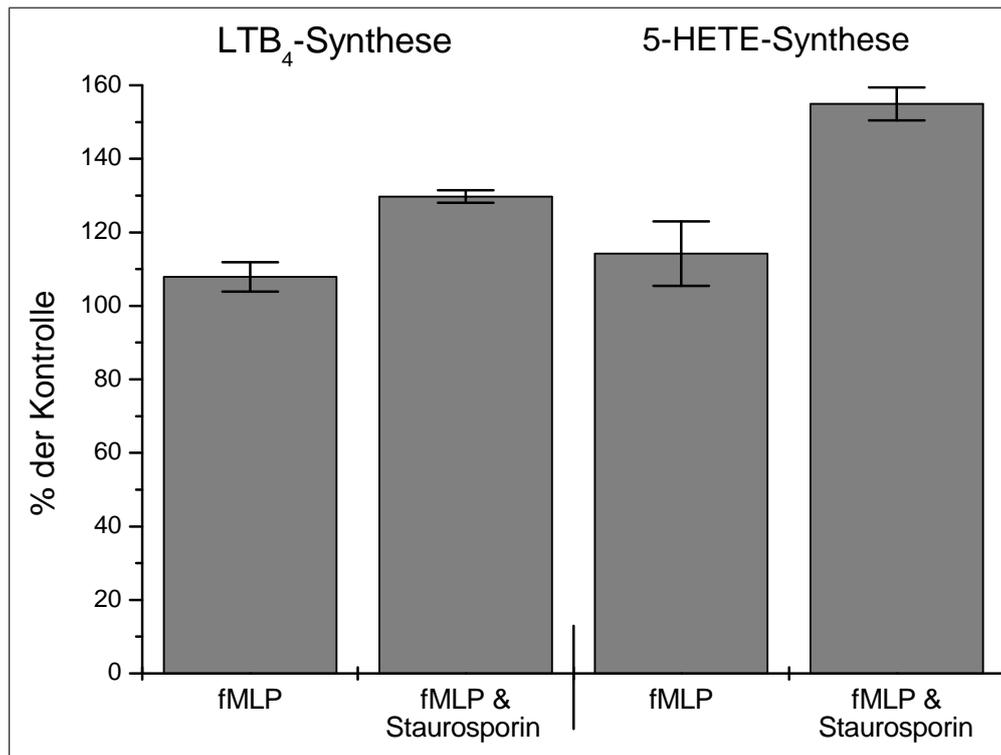


Abbildung 3.10: Effekt von Staurosporin auf die 5-LOX-Aktivität in fMLP-stimulierten PMN. Es wurden zunächst die basalen Konzentrationen der 5-LOX Produkte LTB₄ und 5-HETE bestimmt. Diese Werte wurden als Kontrolle verwendet. Die basale LTB₄ Konzentration betrug $126,4 \pm 5,0$ cpm, die basale 5-HETE Konzentration betrug $140,5 \pm 11,2$ cpm. Nachfolgend wurden die PMN mit 100 nM fMLP stimuliert. In der zweiten Versuchsreihe wurden die Zellen zunächst mit $0,3 \mu\text{M}$ Staurosporin vorinkubiert und dann mit 100 nM fMLP stimuliert. Die Angaben erfolgten in Mittelwert \pm SD, $n = 3$ (siehe Kapitel 3.4.3).

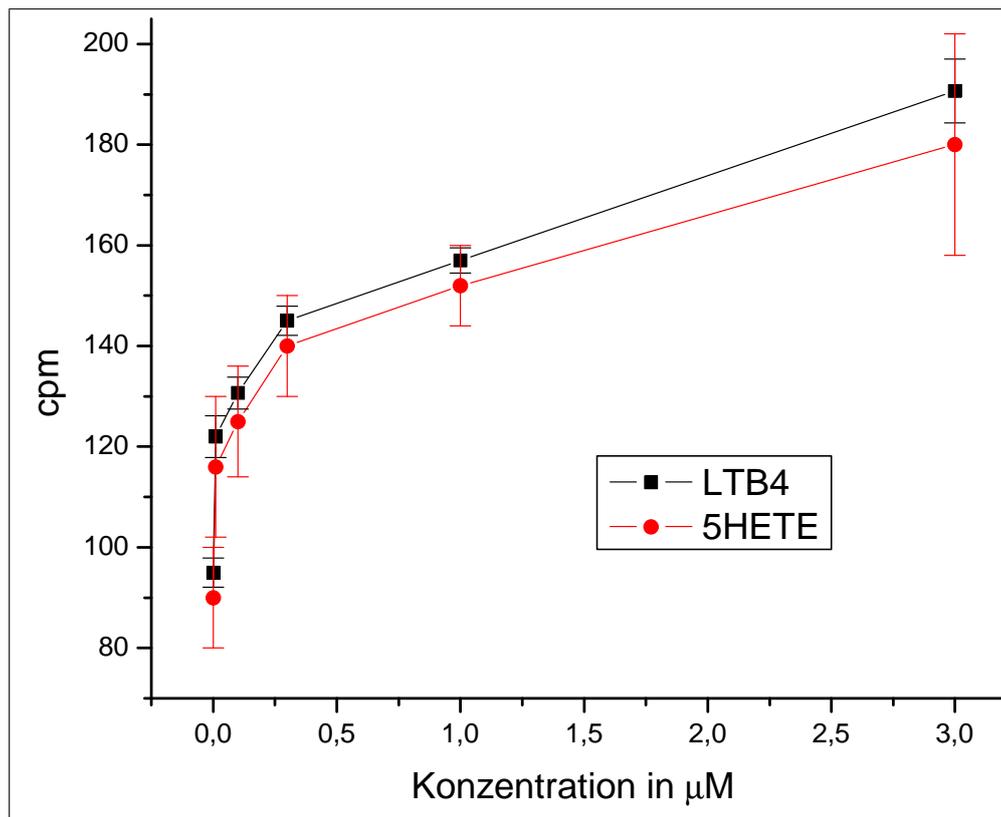


Abbildung 3.11: Wirkung von DPI auf die 5-LOX-Aktivität in fMLP-stimulierten PMN. Die PMN wurden 5 Minuten mit DPI in verschiedenen Konzentrationen inkubiert und nachfolgend mit 100 nM fMLP stimuliert. Die Angaben erfolgten in cpm (Mittelwert \pm SD), $n = 3$ (siehe Kapitel 3.4.3).

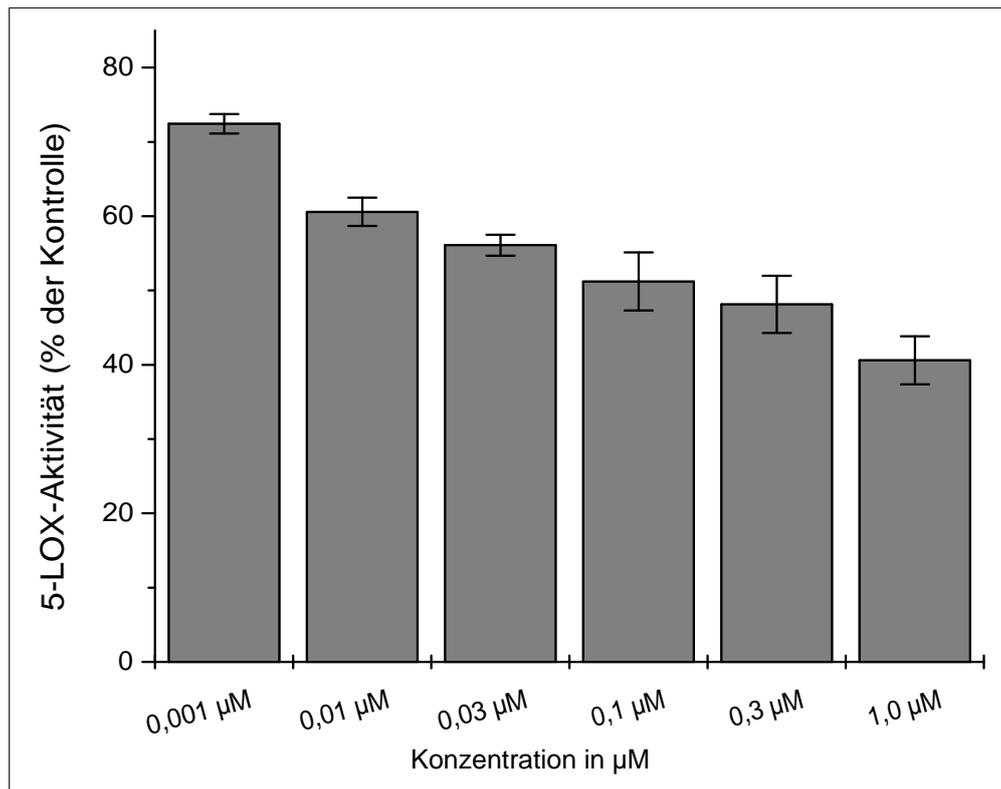


Abbildung 3.12: Effekt von BEL auf die 5-LOX-Aktivität. Die PMN wurden mit 5 μM BEL vorinkubiert, es folgte die Aktivierung mit 100 nM fMLP und die Bestimmung der cpm-Werte der 5-LOX Produkte, wie in Kapitel 2.2 beschrieben. Die Werte wurden in Prozent der Kontrolle angegeben. Definition der Kontrolle als Differenz der Menge der nach 5 Minuten gebildeten 5-LOX Produkte in An- und Abwesenheit von fMLP (siehe Kapitel 2.2.11). Die Kontrollwerte ohne Vorinkubation mit BEL betragen $210 \pm 24 \Delta$ cpm. Die Angaben erfolgten in Mittelwert \pm SD, $n = 3$ (siehe Kapitel 3.4.5).

3.4.5 Einfluß der PAP-Inhibitoren BEL und Propranolol auf die 5-LOX-Aktivität

BEL, der Inhibitor der iPLA₂ und der PAP, wurde zur Untersuchung der 5-LOX-Aktivität eingesetzt. Die Zellen wurden für 5 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors und 300 nM Staurosporin inkubiert, mit 100 nM fMLP stimuliert, und es folgte die Bestimmung der 5-LOX-Metabolite mittels Dünnschichtchromatographie. Die Kontrollwerte ohne Vorinkubation mit BEL betragen $210 \pm 24 \Delta$ cpm. Durch BEL wurde die 5-LOX-Aktivität gehemmt (siehe Abbildung 3.12). In drei unabhängigen Versuchen wurde bei einer Konzentration von 1 μ M BEL eine Inhibition von $59,39 \pm 3,23$ % der Kontrolle festgestellt.

Probe	AA-Produktion in % \pm SD	LTB ₄ -Bildung in % \pm SD
Kontrolle	406 \pm 16	91 \pm 5
Propranolol (200 μ M)	316 \pm 15	152 \pm 8

Tabelle 3.3: Divergierende Effekte des PAP-Inhibitors Propranolol auf die fMLP-induzierte AA-Produktion und die LTB₄-Bildung in PMN nach Vorinkubation mit dem Inhibitor und 300 nM Staurosporin (siehe Kapitel 3.4.5).

In der darauf folgenden Versuchsreihe wurde Propranolol, ein PAP-Inhibitor, eingesetzt. Nach Inkubation der Zellen mit 5 μ M Inhibitor und 300 nM Staurosporin wurden die Metabolite der 5-LOX bestimmt. Die Kontrollwerte ohne Vorinkubation mit Propranolol betragen $200 \pm 18 \Delta$ cpm. Dieser Inhibitor zeigte, wie schon in Kapitel 3.2.2 beschrieben, einen hemmenden Effekt auf die AA-Freisetzung. Im Gegensatz zu MAFP und BEL stimulierte er jedoch die LTB₄-Bildung. Dies läßt die Vermutung zu, daß durch die Blockade des PLD Weges die AA zunehmend durch den 5-LOX-Weg abgebaut wurde (siehe Tabelle 3.3).

In der nachfolgenden Versuchsreihe wurde der synergistische Effekt von BEL und Propranolol auf die AA-Produktion und die 5-LOX-Aktivität untersucht. Die PMN wurden zum einen mit 200 μ M Propranolol zum anderen mit 200 μ M Propranolol und 5 μ M BEL vorinkubiert, es folgte die Aktivierung mit 100 nM fMLP und die Bestimmung der cpm-Werte der 5-LOX Produkte, wie in Kapitel 2.2 beschrieben. Propranolol konnte den inhibitorischen Effekt von BEL auf die LTB₄-Synthese teilweise aufheben (siehe Abbildung 3.13).

3.4.6 Überprüfung der Ergebnisse durch ELISA

Durch ELISA konnte spezifisch die LTB₄-Synthese nach fMLP-Stimulierung bestimmt werden. Die Versuche wurden, wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben, durchgeführt. Nach 7 minütiger Aktivierung der Zellen mit 100 nM fMLP konnte ein Anstieg der LTB₄ Freisetzung auf 5,8 ng/

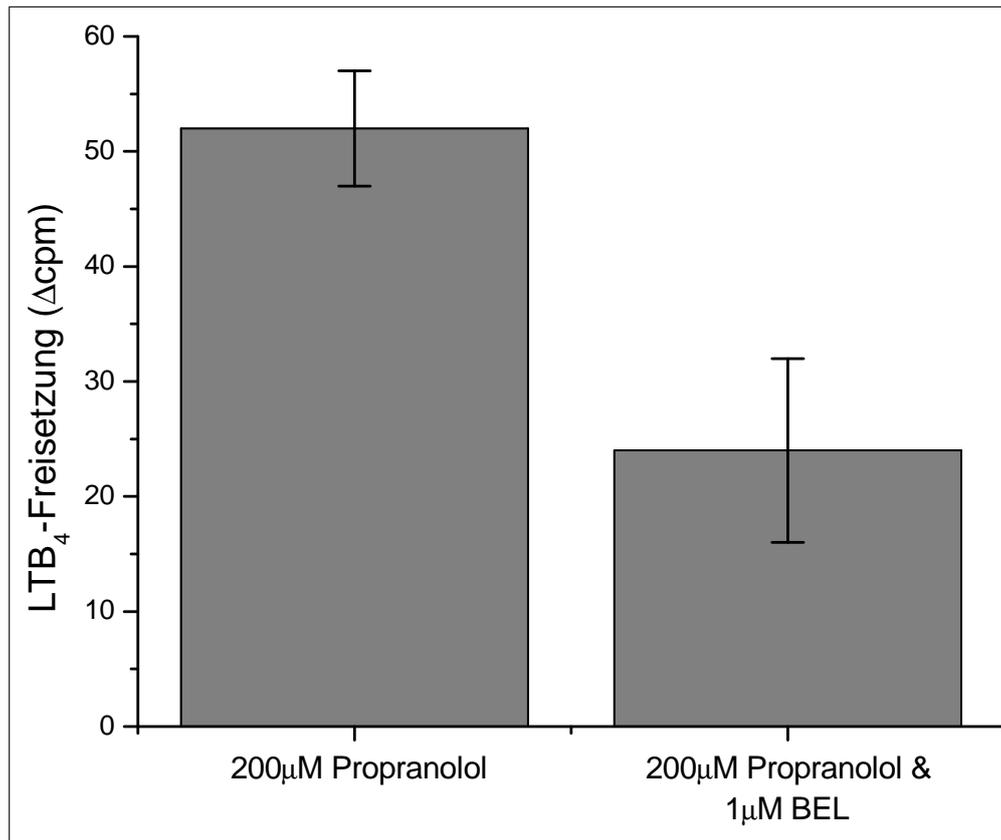


Abbildung 3.13: Effekt von Propranolol und BEL auf die 5-LOX-Aktivität. Die PMN wurden zum einen mit 200 μM Propranolol zum anderen mit 200 μM Propranolol und 5 μM BEL vorinkubiert, es folgte die Aktivierung mit 100 nM fMLP und die Bestimmung der cpm-Werte der 5-LOX Produkte, wie in Kapitel 2.2 beschrieben. Die Angaben erfolgten in Mittelwert \pm SD, $n = 3$ (siehe Kapitel 3.4.5).

10^7 Zellen verzeichnet werden. Die LTB_4 -Konzentration war weitaus geringer als nach Aktivierung der Zellen mit Ca^{2+} -Ionophore A23187 [108].

Durch 5-minütige Vorinkubation mit $5 \mu M$ BEL ging die LTB_4 -Freisetzung nach fMLP Stimulierung auf $1,71 \text{ ng}/10^7$ Zellen zurück. Dies entspricht einer Inhibition von 70 %. 12-epi-SLD ($5 \mu M$) hemmte die LTB_4 Freisetzung nach Zellaktivierung mit fMLP zu 87,77 %. MAFP ($5 \mu M$) konnte die LTB_4 Freisetzung nur schwach beeinflussen. Nach Inkubation (7 min, $37^\circ C$) mit anschließender fMLP-Stimulierung wurde eine Inhibition von 30 % bestimmt. Im Gegensatz zur totalen Zellaktivierung mit Ca^{2+} -Ionophore A23187 wurden in diesen Versuchen nur geringe Mengen LTB_4 freigesetzt. Demzufolge ist eine alleinige Bestimmung der LTB_4 -Konzentration mittels ELISA zur Beurteilung der 5-LOX-Aktivität unter diesen Bedingungen nicht sinnvoll.

3.5 Die Beeinflussung der $[Ca^{2+}]_i$ in fMLP-stimulierten PMN

Die PMN wurden, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, gewonnen und mit Fura II inkubiert. Die Messung erfolgte nach Inkubation mit $1,2 \text{ mM } CaCl_2$ und $1,0 \text{ mM } MgCl_2$. Die Aktivierung der PMN durch 100 nM fMLP erzeugte ein Fluoreszenzsignal, das in den ersten Sekunden stark anstieg, langsam abfiel und nach 4–5 min wieder das Basisplateau erreichte. In einigen Messungen war nach dem ersten Anstieg ein zweiter kleinerer Anstieg sichtbar. Die Basiskonzentration wie auch der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ nach fMLP-Stimulierung waren starken Schwankungen unterworfen. So waren je nach Spender Basiswerte von $80\text{--}190 \text{ nM}$ möglich. Die Konzentrationen stiegen bei fMLP-Stimulierung auf Werte von $380\text{--}1200 \text{ nM}$ an (siehe Tabelle 3.4). Eine repräsentative Kalziumkurve wird in Abbildung 3.14 gezeigt.

In der Auswertung wurde zur Vergleichbarkeit der einzelnen Versuche folgende Darstellung benutzt: Die Differenz zwischen Basiskonzentration und der Konzentration nach fMLP-Stimulierung wurde im Kontrollversuch als 100 % angegeben. Wenn eine Substanz einen inhibitorischen Effekt auf die $[Ca^{2+}]_i$ besitzt, so sind Werte von unter 100 %, bei Aktivatoren Werte von über 100 % zu erwarten.

3.5.1 Einfluß von Inhibitoren des PLA_2 Signaltransduktionswegs

Kalzium ist wesentlich an der Signaltransduktion der verschiedenen PLA_2 beteiligt. Die Gruppe IIa s PLA_2 und die Gruppe IVa c PLA_2 sind direkt kalziumabhängig. Weiterhin ist bekannt, daß die rezeptorvermittelte Zellaktivierung durch fMLP, die PKC und die PLC den Kalziumstoffwechsel beeinflussen. In den folgenden Versuchen wurde der Einfluß der c PLA_2 und PLD-Inhibitoren auf die $[Ca^{2+}]_i$ untersucht. Diese Information ist wichtig für die Deutung der Versuche zur AA-Freisetzung und LTB_4 -Synthese.

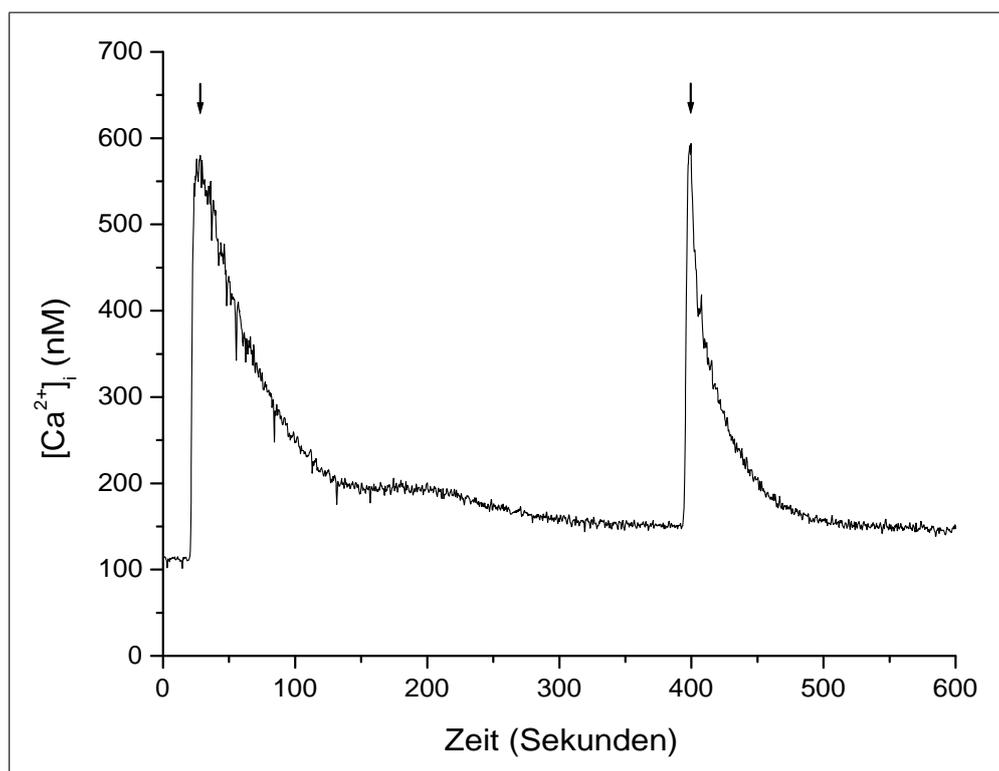


Abbildung 3.14: Die Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ in PMN nach Inkubation mit Fura II und anschließender Stimulierung mit 100 nM fMLP. Die Pfeile geben den Zeitpunkt der fMLP-Zugabe an. Gezeigt wird ein repräsentativer Versuch von 4 durchgeführten Versuchen. Die Angaben der $[Ca^{2+}]_i$ erfolgten in nM (siehe Kapitel 3.5).

3.5. DIE BEEINFLUSSUNG DER $[Ca^{2+}]_i$ IN FMLP-STIMULIERTEN PMN

Spender	$[Ca^{2+}]_i$ ohne Stimulierung	$[Ca^{2+}]_i$ nach fMLP-Stimulierung
1	132	534
2	289	1126
3	117	661
4	118	584
5	138	960
6	180	795
7	93	429
8	82	406
9	170	1038
10	81	393
11	200	656
12	96	411
13	120	374
14	109	576
15	129	430
16	96	411
17	90	408
17	110	250
18	98	255

Tabelle 3.4: Die Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ in PMN nach Stimulierung mit 100 nM fMLP, Angaben in nM (siehe Kapitel 3.5).

An direkten Inhibitoren der verschiedenen PLA_2 wurden folgende Substanzen geprüft:

- BEL,
- MAFP,
- 12-epi-SLD und
- Propranolol.

3.5.2 Die Wirkung von MAFP auf die $[Ca^{2+}]_i$ in PMN

MAFP ist ein direkter Inhibitor der Gruppe IVa cPLA₂ und der Gruppe VIa iPLA₂. Da sowohl die cPLA₂ wie auch die sPLA₂ kalziumabhängig sind, mußte ein direkter Einfluß des Inhibitors auf die $[Ca^{2+}]_i$ ausgeschlossen werden. In der Versuchsreihe hatte MAFP selbst in der höchsten Konzentration keinen Effekt auf die $[Ca^{2+}]_i$. Unter Verwendung von 20 μ M MAFP betrug die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ $93,5 \pm 11,7$ % der Kontrolle (siehe Abbildung 3.15).

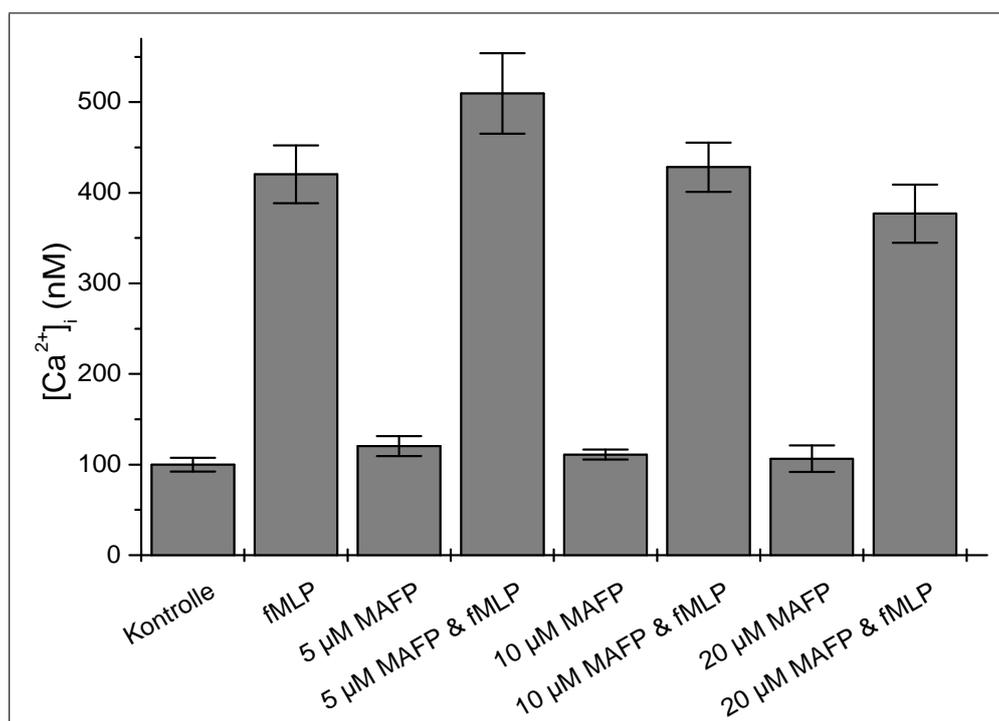


Abbildung 3.15: Wirkung von MAFP auf die $[Ca^{2+}]_i$ in PMN. Die Zellen wurden mit MAFP und $CaCl_2/MgCl_2$ für 5 Minuten vorinkubiert und mit 100 nM fMLP stimuliert. Die Angaben erfolgten in Mittelwert \pm SD, $n = 3$ (siehe Kapitel 3.5.2).

3.5.3 Der Einfluß von BEL auf die $[Ca^{2+}]_i$ in PMN

BEL ist ein Inhibitor der Gruppe VIa iPLA₂. Es besitzt keine Wirkung auf andere PLA₂, doch es wurde gezeigt, das außer iPLA₂ ein Enzym des PLD-Wegs beeinflusst wird, die Phosphohydrolase der PA. In der Versuchsreihe wurde die $[Ca^{2+}]_i$ nach Inkubation der Zellen mit CaCl₂/MgCl₂ und verschiedenen Konzentrationen von BEL (1, 2 und 5 µM) gemessen.

In drei unabhängigen Versuchen betrug die Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ auch unter Verwendung der BEL-Konzentration von 5 µM in Bezug auf die Kontrollkurve $97,4 \pm 3,5$ % (Mittelwert \pm SD). Ein direkter Einfluß von BEL auf die $[Ca^{2+}]_i$ konnte ausgeschlossen wurde.

3.5.4 Der Effekt von Propranolol auf die $[Ca^{2+}]_i$ in PMN

Der β -Adrenorezeptorantagonist Propranolol hemmt ebenso wie BEL die Phosphohydrolase der PA, hat aber keinen Einfluß auf die PLA₂ Enzyme. In der Versuchsreihe wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, isoliert, 5 Minuten bei 37°C mit CaCl₂/MgCl₂ inkubiert und mit fMLP stimuliert. Zunächst wurde die $[Ca^{2+}]_i$ ohne Zugabe eines Inhibitors gemessen. Dann wurde eine Probe mit 5 µM Propranolol und CaCl₂/MgCl₂ für 5 Minuten inkubiert, die andere mit 5 µM Propranolol, 5 µM BEL und CaCl₂/MgCl₂ inkubiert. Die Aktivierung erfolgte mit 100 nM fMLP. Propranolol erzeugte vor der Zugabe von fMLP einen leichten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. Nach Zugabe von fMLP wurde sowohl die Höhe als auch die Länge der Aktivierung gegenüber der Kontrolle beeinflusst. In drei unabhängigen Versuchen konnte ein Anstieg von $36,8 \pm 4,3$ % gegenüber der Kontrolle beobachtet werden.

BEL alleine zeigte, wie oben beschrieben, keinen Effekt. Wenn Propranolol und BEL zusammen zugefügt wurden, konnte BEL das erhöhte Signal des Propranolols senken (siehe Abbildung 3.16).

3.5.5 Die Wirkung von 12-epi-SLD auf die $[Ca^{2+}]_i$ in PMN

12-epi-SLD ist als Inhibitor der 14 kDa Gruppe IIa sPLA₂ beschrieben worden [13]. Die Versuchsreihe wurde mit den Konzentrationen 1, 2 und 5 µM durchgeführt. Die Zellen wurden nach 5 minütiger Vorinkubation mit CaCl₂/MgCl₂ und diesem Inhibitor mit 100 nM fMLP aktiviert. Es zeigten sich folgende Ergebnisse:

Bei Verwendung von 1 µM 12-epi-SLD wurde die $[Ca^{2+}]_i$ auf 60 % erniedrigt, ab einer Konzentration von 2 µM konnten keine Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ nach fMLP-Stimulation beobachtet werden (siehe Abbildung 3.17). Die leicht unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen der $[Ca^{2+}]_i$ sind nicht durch Autofluoreszenz bedingt. Der Effekt zeigte sich nicht konstant in den durchgeführten Versuchen.

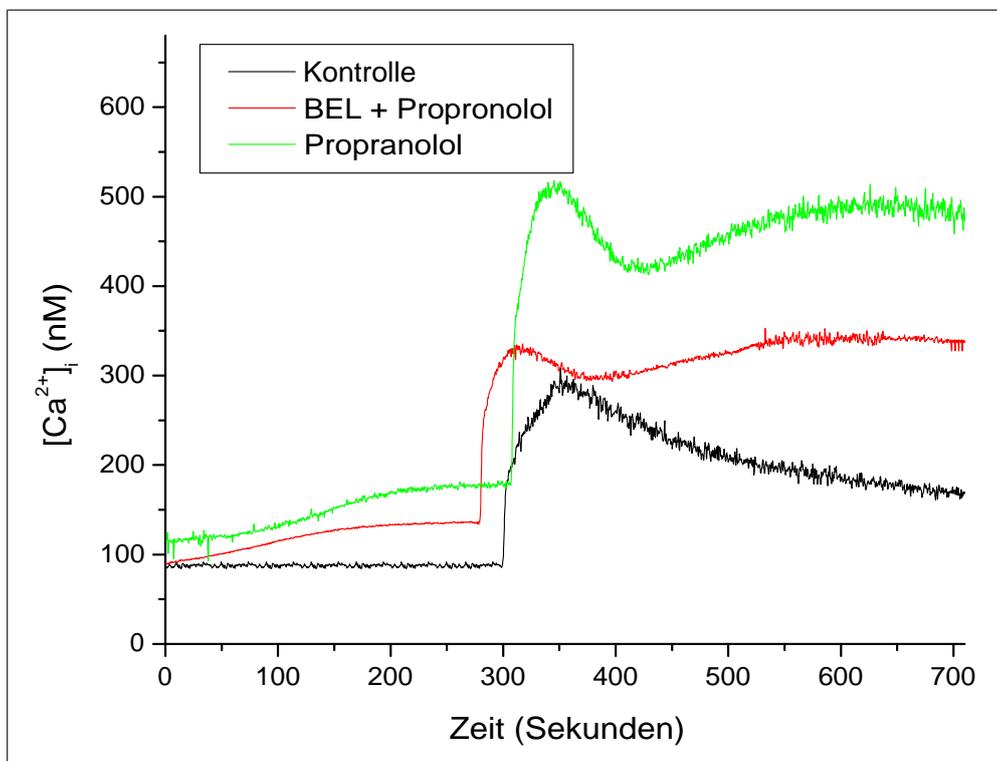


Abbildung 3.16: Einfluß von BEL und Propranolol auf die $[Ca^{2+}]_i$ in PMN. Die Zellen wurden für 5 Minuten mit BEL, Propranolol sowie BEL und Propranolol inkubiert und anschließend mit 100 nM fMLP versetzt. Als Kontrollkurve diente die Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ in PMN nach Stimulierung mit 100 nM fMLP ohne Zugabe eines Inhibitors. Die Zugabe des fMLP erfolgte in dem Kontrollversuch und in der Fraktion mit BEL und Propranolol nach 300 Sekunden, in der Propranololprobe nach 280 Sekunden. Propranolol verursachte schon vor der Zugabe von fMLP einen leichten Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$. Nach fMLP-Aktivierung kam es zur Steigerung des Kalziumsignal in Höhe und Länge. Durch die Zugabe von BEL wurde dieser Effekt vermindert. Das Kalziumsignal nach alleiniger BEL-Gabe ist nicht gezeigt, es entspricht der Kontrollkurve. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von drei durchgeführten Versuchen (siehe Kapitel 3.5.4).

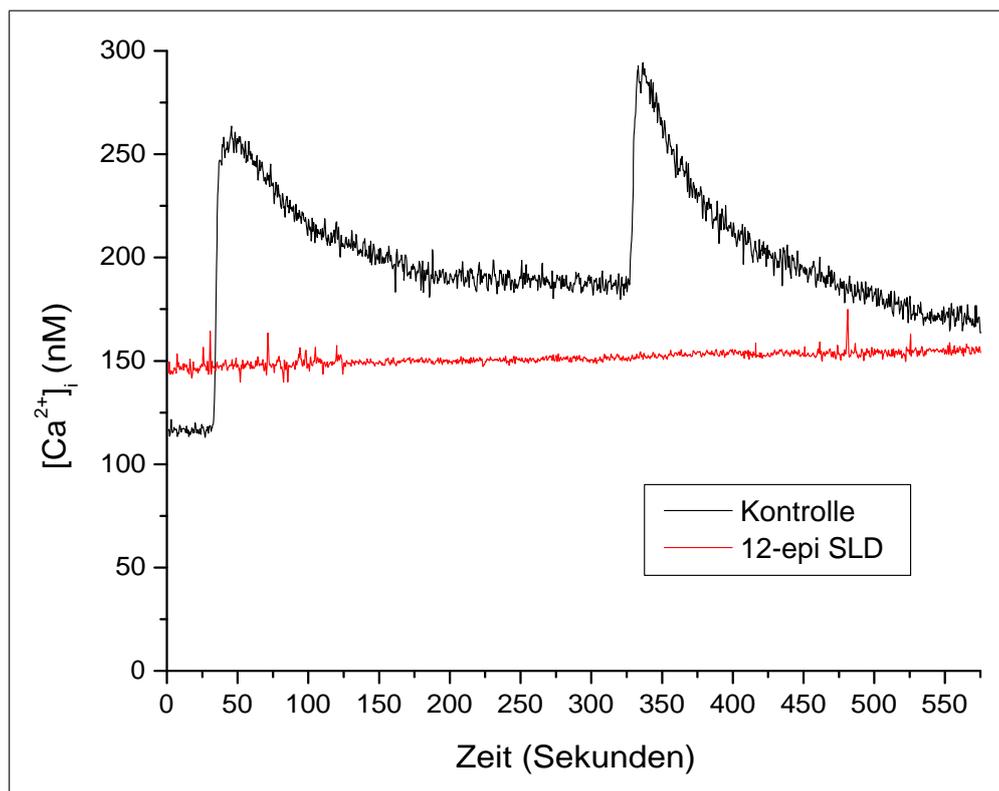


Abbildung 3.17: Wirkung von $2 \mu M$ 12-epi-SLD auf die $[Ca^{2+}]_i$ in PMN nach Aktivierung mit 100 nM fMLP. Die Zellen wurden für 5 Minuten mit 12-epi-SLD inkubiert und anschließend mit 100 nM fMLP versetzt. Als Kontrollkurve diente die Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ in PMN nach Stimulierung mit 100 nM fMLP ohne Zugabe des Inhibitors. Die fMLP-Stimulation erfolgte nach 5 minütiger Vorinkubation mit $CaCl_2/MgCl_2$ (in der Abbildung bei 50 und 350 Sekunden), siehe Kapitel 3.5.5.

3.6 Die Superoxidationenfreisetzung in PMN

O_2^- -Produktion ist durch Reduktion von Cytochrom c spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm mit einem Mikroplatten-Photometer bestimmbar. Die Versuche wurden, wie in Kapitel 2.2.9 beschrieben, durchgeführt. Berechnen konnte man die O_2^- -Produktion mit Hilfe des SoftMax Programms, das die maximale optische Dichte (OD) und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (VD) angibt.

3.6.1 Der Einfluß von DPI auf die O_2^- -Freisetzung

Diphenyliodonium hemmt die mitochondriale NADH-Dehydrogenase in PMN. In diesem Versuch sollte der Effekt auf die O_2^- -Freisetzung untersucht werden. Es zeigte sich eine Hemmung mit ansteigender Konzentration (siehe Tabelle 3.5).

DPI (μM)	0 μM	0,025 μM	0,05 μM	0,1 μM	1 μM	2 μM
Vmax	139,2 \pm 10,2	94,29 \pm 7,6	33,43 \pm 6,7	24,6 \pm 5,4	14,4 \pm 4,2	9,6 \pm 2,4

Tabelle 3.5: Effekt von DPI auf die O_2^- -Freisetzung. Die Angaben erfolgten in Mittelwert \pm SD des Vmax, n = 3.

3.6.2 Der Einfluß von 12-epi-Scalarial auf die O_2^- -Produktion

Um den Effekt von 12-epi-SLD in PMN eingehender zu betrachten, wurde eine Untersuchung zum Einfluß des Inhibitors auf die O_2^- -Freisetzung durchgeführt. Es zeigte sich eine deutliche Hemmung. Unter Verwendung von 5 μM 12-epi-SLD wurde eine Inhibition auf ein Vmax von 9,6 erreicht, die sich mit höherer Konzentration nicht steigern ließ (siehe Tabelle 3.6).

12-epi-SLD (μM)	0 μM	1 μM	5 μM	10 μM
Vmax	35,36 \pm 6,9	16,07 \pm 4,7	9,6 \pm 3,6	9,6 \pm 4,0

Tabelle 3.6: Effekt von 12-epi-SLD auf die O_2^- -Freisetzung, Angaben in Vmax. Die Angaben erfolgten in Mittelwert \pm SD, n = 3.