

4 Diskussion

4.1 Übersicht der Aufgabenstellung

PMN sind lebenswichtige Zellen, die für die Abwehrreaktionen des menschlichen Organismus insbesondere durch die bakterizide Wirkung und die Beteiligung an Entzündungsreaktionen einen hohen Stellenwert haben. Bei Aktivierung der Zellen kommt es zur PMN-Aggregation, Freisetzung reaktiver Oxydanzien, zum Phospholipidremodeling und zur Produktion von AA. Die AA kann daraufhin durch die 5- oder 15-LOX zu LTB₄ oxidiert werden. LTB₄ ist einer der stärksten chemotaktischen Faktoren für Entzündungszellen.

PMN besitzen eine Vielfalt von Rezeptoren, die für ein Priming und die Aktivität ihrer Funktionen essentiell sind. Einer dieser Stimuli ist das fMLP, der Agonist, der per Rezeptoren und G-Proteine die PLC und das NADPH Oxidasesystem aktiviert. fMLP ruft ferner Chemotaxis hervor. Im folgenden werden die Studien zur Aktivierung der Phospholipasen in fMLP stimulierten PMN in Bezug auf die AA-Freisetzung und die LTB₄-Synthese diskutiert.

4.2 Die Detektion der verschiedenen PLA₂

Die Detektion der Gruppe VIa iPLA₂ erfolgte bisher in verschiedenen Monozytensystemen. So wies M. Balboa aus der Arbeitsgruppe von E. Dennis die Gruppe VIa iPLA₂ in P388D₁-Zellen, in Makrophagen und in CHO-Zellen nach [7]. Ein Vorkommen der Gruppe VIa iPLA₂ in PMN erschien wahrscheinlich. Der entsprechende Antikörper wurde durch die Firma Cayman bezogen, so daß mittels Westernblot der Nachweis erbracht werden konnte (siehe Kapitel 3.1.2). Auch für die Gruppe IVa cPLA₂ gelang hierbei durch Westernblot der Nachweis in PMN (siehe Kapitel 3.1.1). Für die Gruppe IIa sPLA₂ mußte der Nachweis ausbleiben. Spezifische humane Antikörper waren nicht erhältlich. Verhoeven et al., University of Amsterdam, wies die sPLA₂ in verschiedenen Leukozyten nach, darunter auch in humanen PMN [24].

4.3. DER EINFLUSS DER VERSCHIEDENEN PLA₂ UND DER PLD AUF DIE AA-FREISETZUNG IN FMLP-STIMULIERTEN PMN

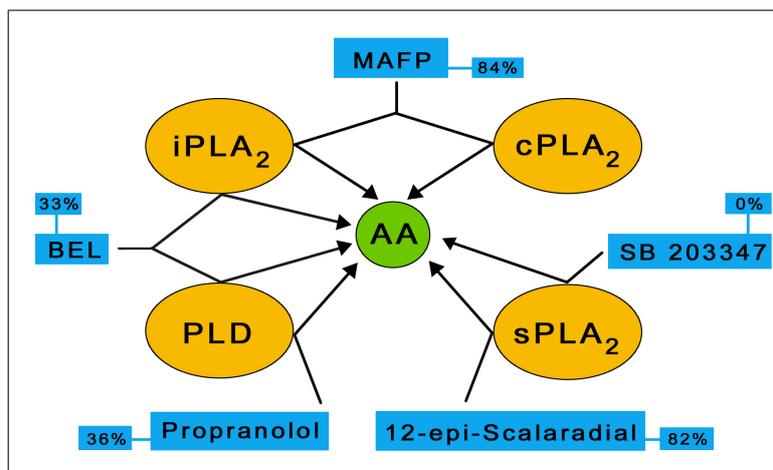


Abbildung 4.1: Die Wirkung der verschiedenen Inhibitoren der PLA₂ und PLD auf die AA-Freisetzung in fMLP-stimulierten humanen PMN (siehe Kapitel 4.3).

4.3 Der Einfluß der verschiedenen PLA₂ und der PLD auf die AA-Freisetzung in fMLP-stimulierten PMN

In humanen PMN kann von dem Vorkommen einer Gruppe VIa iPLA₂, einer IVa cPLA₂ und einer IIa sPLA₂ ausgegangen werden. In Kapitel 3.2.5 wurden die Effekte der verschiedenen Inhibitoren zusammengefaßt (siehe Abbildung 4.1). MAFP, der irreversible Inhibitor der serinenthaltenden Phospholipasen, inhibierte zu ca. 75 % (siehe Kapitel 3.2.1). Es unterscheidet nicht zwischen der Ca²⁺-abhängigen cPLA₂ und der iPLA₂ [100]. Also wurde zudem BEL verwendet, welches von den PLA₂ selektiv die iPLA₂ hemmt [7]. Im Unterschied zu MAFP zeigte sich durch BEL nur eine Inhibition von 35 % bei der fMLP-induzierten AA-Freisetzung (siehe Kapitel 3.2.2). So muß der Effekt von MAFP hauptsächlich auf die cPLA₂ Inhibition zurückgeführt werden. Die signifikante Inhibition von BEL muß nicht zwingend eine Beteiligung der iPLA₂ an diesen Prozessen implizieren, denn BEL ist auch Inhibitor der Mg²⁺-abhängigen Phosphatidphosphorylase (PAP) [10]. Als weiterer Inhibitor wurde der β -Adrenorezeptorantagonist Propranolol [20] verwendet, der eine ähnliche Inhibition wie BEL verursachte (siehe Kapitel 3.2.3). Schon in früheren Versuchen wurde erwiesen, daß Propranolol eine Akkumulation der PA und eine Suppression der DAG-Bildung in fMLP stimulierten PMN verursacht [121]. Dies ließ die Schlußfolgerung zu, daß die durch BEL verursachten Effekte auf die AA-Freisetzung durch die PAP-Inhibition zurückzuführen sind. Diese Überlegung der Beteiligung der PLD an der Signaltransduktion in PMN steht im Einklang mit Ergebnissen anderer Autoren [61, 130]. Der PLD Stoffwechselweg scheint für die MAFP resistente AA-Freisetzung verantwortlich zu sein.

SB 203347, ein Inhibitor der 14-kDa Histidin-enthaltenden Phospholipase A₂ sPLA₂ zeigte

keine Wirkung auf die AA-Freisetzung in fMLP stimulierten PMN (siehe Kapitel 3.2.4). Dies wurde zeitgleich von anderen Autoren beschrieben [174]. Dieser Effekt steht im großen Gegensatz zu der starken Inhibition, die dieser Hemmstoff in Ca^{2+} -Ionophore A23187 stimulierten PMN aufweist [108]. Wahrscheinlich ist diese Diskrepanz auf unterschiedliche Stoffwechselwege der AA-Freisetzung für rezeptor- und nicht-rezeptorgesteuerte Aktivierung der PMN zurückzuführen.

Ein anderer sPLA₂ Inhibitor ist das 12-epi-SDL [13]. Es verursachte eine starke Inhibition der fMLP-induzierten Freisetzung der AA (siehe Kapitel 3.2.4). Eine ähnlich starke Inhibition wurde sonst nur mit MAFP verursacht (siehe Kapitel 3.2.1). Dieses Ergebnis schien dem Versuchsergebnis mit SB 203347 zu widersprechen, doch durch die Versuchsreihe zur Messung der Freisetzung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde das Ergebnis relativiert (siehe Kapitel 3.5.5). Es wurde gezeigt, daß 12-epi-Scalaradial einen starken hemmenden Einfluß auf das $[\text{Ca}^{2+}]_i$ besitzt, so daß durch Verwendung dieses Inhibitors auch kalziumabhängige PLA₂ beeinflußt werden. Der Inhibitor ist somit unspezifisch.

4.4 Der zeitliche Verlauf der AA-Freisetzung

Die Versuchsreihen in Kapitel 3.3 zeigen den zeitlichen Verlauf der AA-Freisetzung in PMN. Die Abbildungen 3.6, 3.7 und 3.8 zeigen die Ergebnisse dieser Versuchsreihen. Die Inhibition entspricht den Ergebnissen der schon besprochenen Versuche zur AA-Freisetzung.

Die Versuche ohne Verwendung eines Inhibitors zeigten einen zunächst steilen Anstieg der AA-Produktion mit leichtem Abfall nach ca. 2 Minuten und nachfolgendem erneutem Anstieg mit einem Maximum nach 4 Minuten (siehe Kapitel 3.3).

Durch die Verwendung von BEL wurde der angedeutete biphasische Verlauf aufgehoben. Einem schnellen Anstieg der AA-Freisetzung folgte ein abgeflachter Kurvenverlauf. Dies läßt sich auf die fehlende PLD Aktivität zurückführen, die scheinbar maßgeblich an der AA-Freisetzung in fMLP-stimulierten PMN beteiligt ist.

Bei Verwendung des Inhibitors MAFP und damit einer Ausschaltung der iPLA₂ und cPLA₂ zeigte sich ein biphasischer Verlauf der AA-Freisetzung. Einem kleinen Anstieg nach 15 Sekunden folgte ein größerer nach 3 Minuten (siehe Abb. 3.7). Anzunehmen ist, daß sowohl die PLC wie auch die PLD hier beteiligt sind. Während der erste Anstieg die initiale PLC Aktivität widerspiegelt, werden durch eine spätere ausgeprägtere PLD Aktivität größere Mengen an AA freigesetzt, wobei insgesamt die AA-Produktion durch die Inhibition der cPLA₂ stark gehemmt wurde.

4.5 Der Einfluß der $[Ca^{2+}]_i$ auf die Signaltransduktion in FMLP-stimulierten PMN

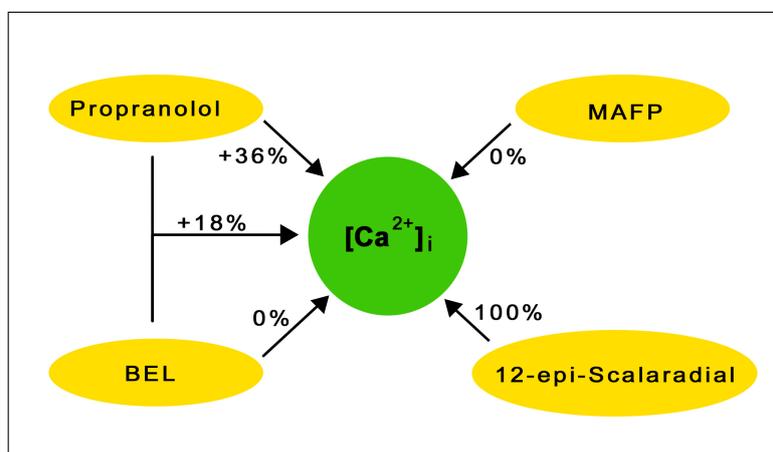


Abbildung 4.2: Die Wirkung der verschiedenen Inhibitoren der PLA_2 und PLD auf die $[Ca^{2+}]_i$ in FMLP-stimulierten humanen PMN (siehe Kapitel 4.5).

Wie in Kapitel 1.4.5 beschrieben, greift die $[Ca^{2+}]_i$ in viele Signaltransduktionswege der mit FMLP stimulierten PMN ein. Sie ist sowohl an der Aktivierung der Zellfunktion wie Degranulation und Phagozytose als auch an der Aktivierung der NADPH-Oxidase beteiligt. Es wurde zunächst die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Aktivierung der Zellen mit FMLP untersucht (siehe Kapitel 3.5). Das Kalziumsignal stieg in den ersten Sekunden stark an, fiel langsam ab und erreichte nach 4–5 Minuten wieder das Basisplateau (siehe Abbildung 3.14). Beobachtet wurden spenderbedingte Variationen der Stimulierbarkeit der PMN bis zu über 100 % (siehe Tabelle 3.4). Eine Aktivierung der Zellen durch die Präparation konnte ausgeschlossen werden. Auch in den Versuchen mit hohen Basiswerten konnte durch FMLP-Aktivierung eine hohe $[Ca^{2+}]_i$ erreicht werden. Eine unterschiedliche Aufnahme oder eine Inaktivierung des FURA-2AM ist unwahrscheinlich, da die Inkubationsbedingungen der Zellen mit FURA-2AM stets konstant gehalten wurden und immer streng unter Lichtausschluß gearbeitet wurde. Es ist in erster Linie von einem unterschiedlichen Aktivitätszustand der Zellen durch Priming vor Präparation der Zellen auszugehen. Weitere Studien sind notwendig, um diesen Effekt ausreichend zu untersuchen.

MAFP, der Inhibitor der $iPLA_2$ und $cPLA_2$ [100], hatte keinen Einfluß auf $[Ca^{2+}]_i$ (siehe Kapitel 3.5.2). So wurden in dieser Hinsicht mögliche Nebeneffekte ausgeschlossen. Dieses Ergebnis erleichterte die Interpretation der Versuchsreihen zur AA-Freisetzung und LTB_4 -Synthese.

Der $sPLA_2$ -Inhibitor 12-epi-SLD [13] erwies sich als starker Inhibitor der FMLP induzierten

$[Ca^{2+}]_i$ (siehe Abbildung 3.17). Bei einer Konzentration von $1 \mu M$ 12-epi-SLD wurde das Signal zu 60 % inhibiert, ab einer Konzentration von $2 \mu M$ zeigte sich keine Veränderung des $[Ca^{2+}]_i$ nach Zellstimulation mit fMLP. Derselbe Effekt wurde für das Isomer SLD beschrieben [13]. Die Hemmung der fMLP-induzierten AA-Freisetzung durch diesen Inhibitor (siehe Kapitel 3.2.4) wurde oben schon diskutiert (siehe Kapitel 4.3). Die Inhibition der AA-Freisetzung scheint also auf einer Hemmung der fMLP-induzierten Erhöhung des $[Ca^{2+}]_i$ und nicht auf einer Inhibition der sPLA₂ zu beruhen. Durch den fehlenden Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ ist eine verminderte Aktivität der cPLA₂ zu vermuten, die für die Translokation zur Nuklearmembran und zur enzymatischen Aktivität Kalzium benötigt. Es wurde in einer zusätzlichen Versuchsreihe der Einfluß von 12-epi-SLD auf die O_2^- -Freisetzung untersucht. Dieser Inhibitor hatte auch hier einen Einfluß (siehe Tabelle 3.6). Aus diesen Gründen scheint das 12-epi-SLD kein geeigneter Inhibitor zum Studium der AA-Freisetzung in PMN zu sein. Warum 12-epi-SLD einen hemmenden Effekt auf $[Ca^{2+}]_i$ besitzt, ist nicht geklärt.

Der Effekt von SB203347 auf $[Ca^{2+}]_i$ wurde nicht untersucht, da sich kein Einfluß auf die AA-Freisetzung gezeigt hatte und nur wenig Material zur Verfügung stand. Eine ausschlaggebende Beteiligung der sPLA₂ an der fMLP-induzierten AA-Freisetzung scheint nicht vorhanden zu sein.

BEL, der Inhibitor der iPLA₂ [7] und der PAP [10], hatte bei alleiniger Gabe keinen sichtbaren Einfluß auf die fMLP-induzierte erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ (siehe Kapitel 3.5.3). Propranolol hingegen, der Inhibitor der PA [121], erzeugte einen leichten Anstieg des Kalziumsignals vor der Zugabe von fMLP, nach Zugabe von fMLP wurde sowohl die Höhe (ca. 33 % Steigerung gegenüber der Kontrolle) als auch die Länge der Aktivierung beeinflusst. Wenn Propranolol und BEL zusammen zugefügt wurden, konnte BEL das erhöhte Signal des Propranolols senken (siehe Abbildung 3.16). Eine mögliche Interpretation wäre, daß durch die Inhibition der PLD der Abbau intrazellulären Kalziums verhindert würde. So ergäbe sich ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. Durch die zusätzliche Gabe von BEL und damit einer zusätzlichen Inhibition der iPLA₂ sank das Kalziumsignal leicht ab. Vermutet wird eine mögliche Triggerfunktion der iPLA₂ auf die PLC. Durch Hemmung der iPLA₂ würde durch eine verminderte IP₃ Produktion eine verminderte $[Ca^{2+}]_i$ resultieren. Das unveränderte Kalziumsignal bei alleiniger Gabe wäre so zu interpretieren, daß durch die Beeinflussung sowohl der PLD wie auch der PLC die $[Ca^{2+}]_i$ konstant bleibt. Weitere Studien sind notwendig, um die Rolle der iPLA₂ in PMN zu untersuchen (siehe Abbildung 4.2).

4.6 5-LOX-Produktion in mit Staurosporin-vorbehandelten PMN

Die PMN wurden mit radioaktiver ¹⁴C-AA markiert und hochgradig mit Serumalbumin gereinigt, um freie Fettsäuren zu entfernen, bevor sie mit fMLP aktiviert wurden. Die Verteilung der Radioaktivität ist in Tabelle 3.2 dargestellt. Ungefähr 75 % der Radioaktivität waren

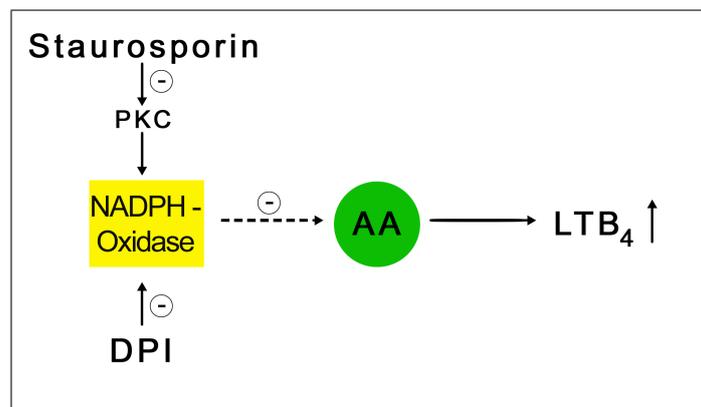


Abbildung 4.3: Der Effekt von DPI und Staurosporin auf die LTB₄-Synthese in fMLP stimulierten PMN (siehe Kapitel 4.6).

in der Fraktion der Triacylglycerine enthalten, die nicht durch eine fMLP Stimulierung beeinflusst wurden. In der Gruppe der verschiedenen Phospholipide waren die Fraktionen der PC und PS und PI am höchsten, die PE nur wenig markiert. 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. 66 % weniger Radioaktivität gefunden wurde.

Dies läßt den Schluß zu, daß die AA nicht der limitierende Faktor für die LTB₄ und andere 5-LOX Produkte sein kann.

Die Effekte des fMLP auf den Eicosanoidmetabolismus zeigte divergierende Ergebnisse. Während ein Anstieg der freien AA in jedem Versuch beobachtet wurde, kam es in nicht allen Versuchen zum Anstieg der 5-LOX-Produkte. Zwei unterschiedliche Versuchsergebnisse sind in Abbildung 3.9 dargestellt. Diese Ergebnisse wurden auch von anderen Forschungsgruppen beschrieben [174]. Ein Erklärungsmodell geht davon aus, daß der Anstieg der 5-LOX-Produkte vom augenblicklichen Zustand der Zellen abhängt, wobei das Priming der Zellen eine wesentliche Rolle zu spielen scheint. Bei geprimten Zellen ist die 5-LOX-Aktivität deutlich erhöht, so daß die Konzentrationen von LTB₄ und anderen 5-LOX-Produkten ansteigt. Der gleiche divergierende Effekt wurde schon in Kapitel 3.5 bei der Erhöhung der [Ca²⁺]_i beobachtet, hier lag die Variationsbreite des [Ca²⁺]_i zwischen 380–1200 nM (siehe Tabelle 3.4).

Die Schlußfolgerung liegt nahe, daß bei einem endogenen Primingprozeß eine positive Korrelation zwischen einer hohen [Ca²⁺]_i und der Aktivierung der 5-Lipoxygenase vorliegt.

Staurosporin ist ein PKC Inhibitor. Es besitzt dadurch einen indirekten Einfluß auf die NADPH-Oxidase. Die Vorbehandlung der Zellen mit Staurosporin führte zu einem Anstieg der AA (siehe Abbildung 3.10). Dies steht im Einklang mit früheren Forschungsergebnissen [120]. Zudem führte die Behandlung mit Staurosporin zu einem Anstieg von ca. 20 % der

5-LOX-Produkte nach fMLP Stimulierung (siehe Abbildung 3.10).

Im Gegensatz zu Staurosporin hemmt DPI die NADPH-Oxidaseaktivität und den „Respiratory Burst“ direkt [126] (siehe Abbildung 4.3). Die Zellen wurden mit DPI vorinkubiert und mit fMLP stimuliert. Mit höheren Konzentrationen des DPI stieg die Konzentration der 5-LOX-Metabolite an (siehe Abbildung 3.11). Die Versuchsreihen mit DPI und Staurosporin ergaben somit ähnliche Resultate. Als Zusatzversuch wurde eine Bestimmung der O₂⁻-Freisetzung nach Vorinkubation der PMN mit DPI durchgeführt. Es ergab sich eine dosisabhängige Inhibition (siehe Tabelle 3.5).

Diese Ergebnisse mit Staurosporin und DPI weisen darauf hin, daß die fMLP-induzierte Freisetzung von AA und Formation der 5-LOX-Produkte nicht vom „Respiratory Burst“ gefördert werden, sondern vielmehr die Unterdrückung des „Respiratory Burst“ zu einem Anstieg dieser Reaktionen führt.

In unserer Arbeitsgruppe wurde in unabhängigen Versuchen mittels HPLC-Analyse der Effekt von Staurosporin auf die 5-LOX-Produkte in fMLP-stimulierten PMN bestimmt. Die verwendeten Zellen waren nicht mit AA markiert. Unter diesen Konditionen wurde eine hohe Konzentration an 5-LOX-Produkten (LTB₄, ω-OH-LTB₄, ω-COOH-LTB₄ und 5-HETE) sichtbar (nicht publizierte Daten). Es kann also ausgeschlossen werden, daß der Effekt von Staurosporin auf markierte Zellen im Zusammenhang mit der Mobilisierung von markierten AA-Speichern steht.

BEL führte nach Vorbehandlung der PMN zu einer dosisabhängigen Hemmung der 5-LOX-Produkte (siehe Abbildung 3.12). Mit MAFP wurde unter gleichen Bedingungen eine Inhibition der 5-LOX-Produkten von ca. 50 % erreicht (siehe Kapitel 3.4.4). Im Gegensatz dazu führte der PAP-Inhibitor Propranolol zu einem divergierenden Effekt von AA-Freisetzung und 5-LOX-Produktion (siehe Tabelle 3.3). Die AA-Freisetzung wurde partiell gehemmt. Dies wurde bereits in PMN von Ratten nachgewiesen [61]. Die LTB₄-Synthese hingegen wurde stimuliert. Dieser Effekt könnte bedeuten, daß eine Hemmung der PLD zu einer Umleitung des AA-Abbaus mit vermehrtem Gebrauch des 5-LOX Weges führt. Es stellte sich heraus, daß die Stimulierung des LTB₄ unabhängig von extrazellulärem Kalzium ist.

4.7 Dissoziation zwischen AA-Produktion und LTB₄-Freisetzung

In den Untersuchungen des Phospholipidstoffwechsels mit Hilfe verschiedener Inhibitoren ist besonders der fehlende Effekt des SB 203347 beachtenswert. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, daß die Gruppe IIa sPLA₂ keine Rolle bei der AA-Produktion in fMLP-stimulierten PMN besitzt. Dies steht im Einklang mit anderen Autoren [174]. Die Ergebnisse verdeutlichen die ausschlaggebende Rolle der Gruppe IVa cPLA₂ und der PLD in diesem System. Diese Schlußfolgerungen schließen nicht aus, daß die sPLA₂ eine Funktion bei Entzündungsreaktionen der

PMN spielt, sondern zeigen nur auf, daß viele alternative Signaltransduktionswege zur AA-Freisetzung führen, die von unterschiedlichen physiologischen Gegebenheiten abhängen.

Der unterschiedliche Grad der AA-Inhibition, der durch MAFP und BEL verursacht wurde, verdeutlicht die prominente Rolle der cPLA₂ bei der Freisetzung der AA in fMLP-stimulierten PMN (siehe Abbildung 4.1). Die cPLA₂-Aktivität ist abhängig von der $[Ca^{2+}]_i$. Zum einen verursacht Ca²⁺ die Translokation der cPLA₂ zur Kernmembran [136] und zum ER, zum anderen ist es Kofaktor der enzymatischen Aktivität. Aus diesem Grund wird bei erniedrigter $[Ca^{2+}]_i$ die cPLA₂ vermittelte AA-Freisetzung gehemmt, wie in den Versuchsreihen mit 12-epi-SLD gezeigt wurde. Die cPLA₂ ist demnach ein Enzym, das zur AA-Mobilisierung führt. Es scheint, daß es das entscheidende Enzym zur Herstellung der 5-LOX-Produkte ist. Erleichternd für die LTB₄-Synthese ist, daß sowohl die cPLA₂ als auch die 5-LOX-Enzyme und die 5-LOX aktivierenden Enzyme an der Nuklearmembran lokalisiert sind. Besondere Bedeutung gilt dem Fakt, daß die meisten Enzyme und andere Faktoren, die an der LTB₄-Synthese beteiligt sind, kalziumabhängig sind. Agonisten, die fähig sind, $[Ca^{2+}]_i$ zu erhöhen, scheinen zu einer gesteigerten AA-Freisetzung und teilweise zu einer LTB₄-Synthese zu führen.

In der Arbeit liegen verschiedene Ergebnisse vor, die für die Dissoziation von AA-Freisetzung und LTB₄-Synthese in fMLP-stimulierten PMN sprechen:

- Während die AA-Freisetzung konstant in allen Experimenten beobachtet werden konnte, kam es nur in einigen Versuchen zum Anstieg des LTB₄ und der anderen 5-LOX-Produkte.
- Die Konzentration der 5-LOX-Produkte war im selben Experiment immer geringer als die Menge der AA-Freisetzung. Dieses Ergebnis schließt die Möglichkeit aus, daß die absolute Menge der AA-Ausschüttung der limitierende Faktor für die Synthese der 5-LOX-Produkte darstellt.
- Der PAP Inhibitor Propranolol zeigte einen divergierenden Effekt auf AA- und 5-LOX-Produktion. Während die AA-Freisetzung gehemmt wurde, konnte eine Stimulierung der 5-LOX-Produktion beobachtet werden.

Diese Dissoziation der Enzymaktivitäten konnte durch Aktivierung der Zellen mit Ca²⁺-Ionophore A23187 nicht festgestellt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse können die Annahme nicht bestätigen, daß die Freisetzung der AA den limitierenden Faktor für die LTB₄-Synthese in fMLP stimulierten PMN darstellt, wie in einigen Veröffentlichungen behauptet wird [128]. Solche Annahmen sind wahrscheinlich durch Mißinterpretation früherer Arbeiten entstanden, in denen berichtet wird, daß die LTB₄-Synthese in fMLP stimulierten PMN durch Hinzufügung von exogener AA gesteigert werden kann [175]. Exogene AA verursacht eine Mobilisierung von intrazellulärem Kalzium mit starkem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$, durch die sich die Stimulierung der 5-LOX erklären läßt.

Wenn das Angebot der AA der geschwindigkeitsbestimmende Faktor wäre, würde die Menge der gemessenen freien AA immer niedriger als die Menge der 5-LOX-Produkte sein. Mit anderen Worten: In fMLP-stimulierten PMN muß es einen Kontrollschritt geben, der bei cPLA₂-Aktivität eine bestimmte Menge an LOX-Produkten freisetzt. Die enzymatische Aktivität der 5-LOX als limitierender Faktor kann hierbei ausgeschlossen werden, da nach Aktivierung der PMN mit Ca²⁺-Ionophore A23187 eine viel größere Produktion der 5-LOX-Produkte als nach fMLP-Stimulierung stattfindet [70]. Die enzymatische Aktivität wird also nach fMLP-Aktivierung nicht vollständig ausgenutzt. Eine Rolle des Hydroperoxids für die Kontrolle des 5-LOX-Weges, wie es in Leukozyten beschrieben wurde [191], kann ausgeschlossen werden, da große Mengen von Oxidanzien (eingeschlossen dem Hydroperoxid) beim „Respiratory Burst“ gebildet werden. Der „Respiratory Burst“ unterstützt jedoch die 5-LOX-Aktivität. Nach Betrachtung dieser Aspekte scheint es wahrscheinlich, daß in fMLP-stimulierten PMN die [Ca²⁺]_i den limitierenden Faktor der 5-LOX Aktivität darstellt. Es ist nicht auszuschließen, daß ein definierter abgegrenzter Pool von AA in der Kernmembran vorhanden ist und zur Limitierung der LTB₄-Synthese führt.

Die Beobachtung, daß bei Aktivierung der PMN mit fMLP eine signifikant höhere AA-Freisetzung als Synthese der 5-LOX-Produkte vorliegt, obwohl beide Prozesse kalziumabhängig sind, ist durch den unterschiedlichen Kalziumbedarf der Enzyme zu erklären: für die Aktivität der cPLA₂ wird eine niedrigere Kalziumkonzentration benötigt als für die 5-LOX, so daß eine geringe Kalziumkonzentration für die cPLA₂-Aktivität, nicht aber für die 5-LOX-Aktivität ausreicht.

Die durchgeführten Untersuchungen haben zudem die besondere Rolle der PLD im AA-Metabolismus in fMLP-stimulierten PMN aufgezeigt; dies steht im Einklang mit anderen Autoren [57, 130, 61, 17]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß Propranolol, ein PAP-Inhibitor, eine partielle Inhibition der AA und zugleich einen Anstieg der LTB₄-Synthese verursacht. In früheren Arbeiten aus der Arbeitsgruppe wurde unter gleichen Versuchsbedingungen bei Verwendung von Propranolol nach fMLP-Stimulierung ein Anstieg der PA um den Faktor 2,5 sichtbar. Die zelluläre Konzentration der PA zeigte bei Vorbehandlung der Zellen mit Staurosporin einen starken Anstieg, während bei dem PAP-Produkt DAG ein inverser Effekt aufgezeigt wurde [120]. Dies läßt den Schluß zu, daß die Produktion von LTB₄ in fMLP-stimulierten PMN von einem Anstieg der PA abhängt, die zu den wichtigsten Mediatoren in der Signaltransduktion der PMN gehört [55]. Bekannt ist, daß die PA intrazelluläres Kalzium mobilisieren kann [162]. Ein Anstieg der [Ca²⁺]_i, der durch die PA verursacht wurde, findet besonders an der Kernmembran statt, an der auch die 5-LOX lokalisiert ist. Dies könnte der Grund für den durch Propranolol verursachten Anstieg der LTB₄-Konzentration sein. Die Untersuchungen zeigten, daß Propranolol einerseits die Freisetzung der AA inhibiert, andererseits die LTB₄-Produktion steigert. Dies erscheint widersprüchlich, wenn man von dem klassischen Konzept ausgeht, daß die Herstellung der 5-LOX-Produkte von der Freisetzung

der AA abhängt.

Der Grund für die partielle Inhibition der AA mit Propranolol muß weiter untersucht werden. Nur ein bestimmter Anteil scheint für die erhöhte LTB₄-Synthese notwendig zu sein. Fujita et al. haben in PMN von Ratten in fMLP-stimulierten Zellen eine Inhibition der AA-Freisetzung mit Propranolol beschrieben [61] und stützten damit die vorliegenden Ergebnisse. Gleichzeitig zeigte sich in ihrer Arbeit keine Inhibition bei Verwendung eines Inhibitors der Diacylglycerollipase. Sie kamen zu dem Schluß, daß die Aktivität der cPLA₂ abhängig von dem PLD Stoffwechselweg sei. Auch Boultry und Wooten et al. befürworteten eine Schlüsselstellung der PLD bei der Eicosanoidproduktion [17].

Es wird beschrieben, daß die PLD eine entscheidende Rolle bei dem „Respiratory Burst“ in PMN spielt [130]. Aus diesem Grund wurden die Zellen in den Experimenten mit Staurosporin vorbehandelt. Unter diesen Bedingungen wird der „Respiratory Burst“ völlig unterdrückt.

Die Versuchsreihen mit BEL, dem Inhibitor der PAP, und der iPLA₂, ergaben die gleiche Hemmung der AA wie mit Propranolol, dem selektiven Inhibitor von PAP. Der mögliche Schluß wäre, daß die PAP maßgeblich an der AA-Produktion beteiligt wäre, während die iPLA₂ eine untergeordnete Rolle spielen würde. Einen möglichen Einfluß der iPLA₂ auf den AA-Metabolismus in fMLP-stimulierten PMN kann trotzdem nicht ausgeschlossen werden. Die Beobachtung, daß Propranolol aber nicht BEL einen Anstieg der LTB₄-Synthese aufweist, weist möglicherweise auf eine spezifische Rolle der iPLA₂ in dem 5-LOX-Stoffwechsel hin. Die iPLA₂ ist am Phospholipidremodeling beteiligt [7]. Da die 5-LOX-Reaktion an der Kernmembran lokalisiert ist und die cPLA₂ bei Aktivierung hierher transloziert [140], scheint es verständlich, daß die AA aus den Phospholipiden der Kernmembran frei wird. Denkbar wäre, daß dieser Prozeß eine intrazelluläre Umformung der AA benötigt, der durch die iPLA₂ katalysiert wird. Eine besondere Schwierigkeit in der Untersuchung der iPLA₂ in diesem System ist die Tatsache, daß durch fMLP Aktivierung der Zellen immer ein Anstieg des [Ca²⁺]_i stattfindet und so kalziumabhängige und kalziumunabhängige Prozesse nicht eindeutig auseinandergehalten werden können.

Unter Verwendung von Inhibitoren des NADPH Oxidasesystems (Staurosporin und DPI) wurde ein leichter Anstieg der 5-LOX-Produkte festgestellt. Dieser Effekt soll vor dem Hintergrund der Ergebnisse der Arbeitsgruppe Borgeat erläutert werden. Ihre Ergebnisse ergaben, daß fMLP zu einer schnellen Inaktivität der 5-LOX-Produktion in humanen PMN führt [174]. Der „Respiratory Burst“ wird begleitet von der Bildung von reaktiven Oxidanzien. Diese führen wahrscheinlich zur Inaktivierung der 5-LOX, die hochsensibel auf Oxidanzien reagiert. Die NADPH-Oxidaseinhibitoren scheinen der Inaktivierung entgegenzuwirken. Hervorzuheben ist noch, daß die Bildung der 5-LOX-Produkte nach fMLP-Stimulierung trotz Verwendung von NADPH-Oxidaseinhibitoren viel geringer ausfiel als nach Aktivierung der Zellen mit Ca²⁺-Ionophore A23187.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben vor, daß die $[Ca^{2+}]_i$ der limitierende Faktor der LTB₄-Produktion in fMLP stimulierten PMN ist. Diese Schlußfolgerung ist hauptsächlich durch Ausschluß anderer Faktoren möglich. So besitzt, wie oben beschrieben, weder die AA noch die enzymatische Aktivität der 5-LOX die Schlüsselfunktion in diesem Signaltransduktionsweg.

Die Arbeit mit Inhibitoren kann niemals die Spezifität von molekularbiologischen Untersuchungsmethoden erreichen. Deswegen wurde in dieser Arbeit durch Verwendung von verschiedenen Inhibitoren mit zum Teil ähnlicher Wirkung diese Fehlerquelle möglichst gering gehalten, jedoch sind unspezifische, nicht bekannte Wirkungen der Inhibitoren nie ganz auszuschließen. Somit können durch Experimente mit Inhibitoren nur Tendenzen aufgezeigt werden, die durch molekularbiologische Untersuchungen weiter bestätigt werden müssen.

Folgende Schlußfolgerungen können unter diesem Vorbehalt gezogen werden:

- Die Gruppe IVa cPLA₂ ist das Schlüsselenzym für die Freisetzung von AA und die Produktion von LTB₄ in fMLP-aktivierten PMN.
- Weder das Angebot an AA, noch die 5-LOX oder das Hydroperoxid sind die limitierenden Faktoren für die LTB₄-Produktion.
- Der PLD Stoffwechselweg triggert die LTB₄-Produktion durch das Angebot an PA. Diese erhöht das $[Ca^{2+}]_i$.
- Die Länge und Stärke des Kalziumsignals sind die kausalen Faktoren für die fMLP-induzierte LTB₄-Synthese.