

Aus der Frauenklinik des Universitätsklinikums Benjamin Franklin
der Freien Universität Berlin

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Kühn (kommissarisch)

Studien über die Aktivierung der Phospholipasen
in N-Formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin stimulierten
humanen neutrophilen Granulozyten

Dissoziation zwischen Arachidonsäurefreisetzung und
Leukotrien B₄-Synthese

Studies of the Activation of Phospholipases
in N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine Stimulated
Human Neutrophils

Dissociation between Release of Arachidonic Acid and
Leukotriene B₄ Synthesis

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von: Anna-Carina Strunck
aus: Hamburg

Referent: Dr. Dr. Dr. hc Santosh Nigam
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Roland Seifert

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der Freien Universität
Berlin

Promoviert am: 05.09.2003

Zusammenfassung

Leukotrien B₄ (LTB₄) ist ein wichtiger proinflammatorischer Mediator, der in neutrophilen Granulozyten (PMN) produziert wird und in diesen Zellen besonders starke chemotaktische Aktivität aufweist. Deswegen scheint dieses Eicosanoid eine besondere Rolle bei der Rekrutierung von PMN in Entzündungsreaktionen zu spielen.

PMN besitzen eine Vielzahl von Rezeptoren, die am Priming und an der Zellaktivität beteiligt sind. Unter Priming versteht man eine Konditionierung der Zellen, durch die ein anderer Stimulus eine verstärkte Aktivität der Zellen hervorrufen kann. Einer von diesen Rezeptoren ist der Formyltripeptidrezeptor (FPR). Er vermittelt sowohl Chemotaxis als auch die Aktivierung des Nicotinamadeninindinukleotidphosphat-Oxidasesystems (NADPH-Oxidasesystems). Es ist bekannt, daß hierbei die LTB₄-Synthese nur wenig angeregt wird, obwohl sowohl Arachidonsäure (AA) freigesetzt als auch die intrazelluläre Kalziumkonzentration (Ca_i²⁺) stark erhöht wird, beides Faktoren, die für die LTB₄-Formation gebraucht werden.

Um diesen Widerspruch aufzuklären, wurden die Freisetzung von AA und die LTB₄-Synthese in mit ¹⁴C-AA markierten PMN unter Verwendung von verschiedenen Inhibitoren des Phospholipidstoffwechsels untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, daß der größte Anteil der AA-Freisetzung durch die cytosolische Phospholipase A₂ Gruppe IVa (cPLA₂) und die Phospholipase D (PLD) ausgelöst wurde, während die sekretorische Phospholipase A₂ (sPLA₂) keine Rolle zu spielen scheint. Durch die Hemmung der Phosphohydrolase der Phosphatidsäure (PA) mit Propranolol kam es zum Abfall der AA-Freisetzung, jedoch zum Anstieg der 5-Lipoxygenase-Aktivität (5-LOX-Aktivität). Eine Inhibition der NADPH-Oxidase-Aktivität verursachte einen leichten Anstieg der 5-LOX-Produkte. Die Länge und Stärke des Kalziumsignals sind scheinbar die kausalen Faktoren für die fMLP-induzierte LTB₄-Synthese. Weder die freie AA noch die enzymatische Aktivität der 5-LOX sind die limitierenden Faktoren für die fMLP induzierte Produktion des LTB₄.

Abstract

Leukotriene B₄ (LTB₄) is an important proinflammatory mediator which is produced by neutrophils (PMN) and exhibits potent chemotactic activity towards various inflammatory cells. Therefore this eicosanoid is believed to play a central role in the recruitment of PMN at inflammatory sites. PMN possesses a number of receptors that are essential for priming and activation of their functions (Priming means a treatment that does not itself elicits a response in a cell system but induces an enhanced capacity of a cell to respond to a second stimulus). One of the receptors is the formyl tripeptide receptor (FPR) the agonists of which cause both chemotaxis and activation of the NADPH oxidase system. However, formyl peptides such as formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) are known to be inducers of LTB₄ synthesis in human PMN, albeit they cause both rise of cytosolic calcium concentration and liberation of arachidonic acid (AA). Both of them are required for LTB₄ formation.

To elucidate this discrepancy, we investigated AA-release and LTB₄ synthesis from ¹⁴C-AA prelabelled cells by the use of various inhibitors of the phospholipid metabolism.

From our results we conclude that the major part of AA-release is triggered by cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) and phospholipase D (PLD) pathways without any involvement of secretory phospholipases A₂ (sPLA₂). The blockade of phosphatidic acid (PA) phosphohydrolase by propranolol in the PLD pathway leads to a decrease in AA-release and concomitantly to a significant increase in LTB₄-synthesis. Inhibition of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase activity caused only slight enhancement of the LTB₄ formation.

We believe, that the extent and duration of the cytosolic Ca²⁺ signal, and not the overall supply of free AA or 5-lipoxygenase activity (5-LOX activity), are limiting factors for the fMLP-elicited LTB₄ synthesis.

All jenen, die durch ihre Unterstützung am Gelingen dieser Arbeit teilhatten, möchte ich an dieser Stelle ganz herzlich danken.

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Dr. Dr. Dr. hc Nigam für die Überlassung des spannenden Themas, die wissenschaftliche Beratung und die herzliche Betreuung bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Ich möchte ihm für die uneingeschränkte Unterstützung danken.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Schewe. Durch die wertvollen Diskussionen und konstruktiven Hinweise habe ich wichtige Anregungen bekommen.

Vielen Dank an Herrn Sutherland. Die gute Betreuung und stete Hilfsbereitschaft ermöglichten mir das Beherrschen der angewendeten Methoden. Er war immer offen für Fragen und fachliche Diskussionen.

Ein ganz besonderer Dank geht an Frau Nigam. Sie war als ausgleichende und gute Seele für die Arbeitsgruppe unersetzlich und hat uns das Laborleben genießen lassen.

Nicht zuletzt einen großen Dank an Matthias Klose für den Rückhalt und die unendliche Geduld und an meine Familie, die interessiert die Entstehung der Arbeit verfolgt hat und immer als geistiger Beistand für mich da war.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der humane polymorphkernige neutrophile Leukozyt	2
1.2	Die Rolle der PMN in Entzündungsreaktionen	3
1.3	Aktivatoren der PMN	5
1.3.1	LTB ₄	6
1.3.2	Komplementfaktor C5a	6
1.3.3	PAF	7
1.3.4	Cytokine	7
1.3.5	fMLP	8
1.4	Die Signaltransduktion in PMN	8
1.4.1	Die G-Proteine	8
1.4.2	Die Phospholipase C	9
1.4.3	Die Proteinkinase C	11
1.4.4	Die Phospholipase D	11
1.4.5	Die Rolle der Kalziumionen in PMN	12
1.5	Der Aufbau und die Bedeutung der Phospholipasen A ₂	14
1.5.1	Die Gruppe IVa cPLA ₂	17
1.5.2	Die Gruppe VIa iPLA ₂	18
1.5.3	Die Gruppe IIa sPLA ₂	21
1.6	Der Arachidonsäurestoffwechsel	23
1.6.1	Der Lipoxygenaseweg	23
1.6.2	Der Cyclooxygenaseweg	24
1.6.3	AA als Aktivator der NADPH-Oxidase	25
1.7	Zielsetzung der Arbeit	25
2	Material und Methoden	27
2.1	Material	27
2.1.1	Biomaterial	27
2.1.2	Chemikalien	27
2.1.3	Pufferlösungen	28
2.1.4	Geräte und Software	28
2.2	Methoden	29
2.2.1	Isolierung von humanen PMN aus peripherenvenösem Blut	29
2.2.2	Intrazelluläre Kalziummessung	30
2.2.3	Inkubation der PMN	31
2.2.4	Extraktion der AA und der 5-LOX-Metabolite	31
2.2.5	Radiodünnschichtchromatographie	31

2.2.6	TLC-Scanner	32
2.2.7	LTB ₄ -Messung mit ELISA	32
2.2.8	Flüssigkeits-Szintillationsmessung	32
2.2.9	Produktion von Superoxidanionen (O ₂ ⁻)	32
2.2.10	Westernblot	33
2.2.11	Statistik	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Westernblots zur Detektion der PLA ₂	35
3.1.1	Detektion der Gruppe IVa cPLA ₂	35
3.1.2	Detektion der Gruppe VIa iPLA ₂	35
3.1.3	Zusammenfassung	36
3.2	Die Effekte der PLA ₂ -Inhibitoren auf die AA-Freisetzung	36
3.2.1	MAFP, ein Inhibitor der iPLA ₂ und cPLA ₂	37
3.2.2	BEL, ein Inhibitor der Gruppe VIa iPLA ₂ und PAP	39
3.2.3	Propranolol, ein PAP-Inhibitor	39
3.2.4	12-epi-SLD und SB 203347, zwei Typ II PLA ₂ Inhibitoren	39
3.2.5	Zusammenfassung	43
3.3	Die zeitabhängige AA-Freisetzung in PMN	43
3.4	Die Bildung von 5-LOX Produkten in PMN	47
3.4.1	Der Einfluß von AA auf die 5-LOX	47
3.4.2	Der Einfluß des fMLP auf die 5-LOX Aktivität	47
3.4.3	Vorbehandlung der PMN mit Staurosporin und Diphenyliodonium	48
3.4.4	Einfluß von MAFP auf die 5-LOX-Aktivität	48
3.4.5	Einfluß der PAP-Inhibitoren BEL und Propranolol auf die 5-LOX-Aktivität	53
3.4.6	Überprüfung der Ergebnisse durch ELISA	53
3.5	Die Beeinflussung der [Ca ²⁺] _i in fMLP-stimulierten PMN	55
3.5.1	Einfluß von Inhibitoren des PLA ₂ Signaltransduktionswegs	55
3.5.2	Die Wirkung von MAFP auf die [Ca ²⁺] _i in PMN	57
3.5.3	Der Einfluß von BEL auf die [Ca ²⁺] _i in PMN	59
3.5.4	Der Effekt von Propranolol auf die [Ca ²⁺] _i in PMN	59
3.5.5	Die Wirkung von 12-epi-SLD auf die [Ca ²⁺] _i in PMN	59
3.6	Die Superoxidanionenfreisetzung in PMN	62
3.6.1	Der Einfluß von DPI auf die O ₂ ⁻ -Freisetzung	62
3.6.2	Der Einfluß von 12-epi-Scalaradial auf die O ₂ ⁻ -Produktion	62
4	Diskussion	63
4.1	Übersicht der Aufgabenstellung	63
4.2	Die Detektion der verschiedenen PLA ₂	63
4.3	Der Einfluß der verschiedenen PLA ₂ und der PLD auf die AA-Freisetzung in fMLP-stimulierten PMN	64
4.4	Der zeitliche Verlauf der AA-Freisetzung	65
4.5	Der Einfluß der [Ca ²⁺] _i auf die Signaltransduktion in fMLP-stimulierten PMN	66
4.6	5-LOX-Produktion in mit Staurosporin-vorbehandelten PMN	67
4.7	Dissoziation zwischen AA-Produktion und LTB ₄ -Freisetzung	69

Literaturverzeichnis	73
Index	90
Lebenslauf	94

Abbildungsverzeichnis

1.1	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines PMN	2
1.2	Die Schritte der Phagozytose	4
1.3	Der Ablauf des „Respiratory Burst“	5
1.4	Die Funktion der G-Proteine	10
1.5	Die Aktivierung der Phospholipase D	12
1.6	Die Aktivierung der cPLA ₂	17
1.7	Die iPLA ₂ und das Phospholipidremodeling	19
1.8	Die Stimulation der sPLA ₂ durch Ca ²⁺ -Ionophore A23187	21
1.9	Der Lipoxygenaseweg	23
1.10	Der Cyclooxygenaseweg	25
2.1	Die Isolierung von PMN	29
2.2	Aufbau des Westernblotts	33
3.1	Westernblots zur Detektion der cPLA ₂ und iPLA ₂ in humanen PMN	36
3.2	Vorversuch zur MAFP-Wirkung auf die AA-Produktion in PMN	38
3.3	BEL-Wirkung auf die AA-Produktion in PMN	40
3.4	Effekt von Propranolol auf die AA-Produktion in PMN	41
3.5	12-epi-SLD-Wirkung auf die AA-Produktion in PMN	42
3.6	Zeitabhängige Freisetzung von AA in PMN nach Stimulierung mit fMLP	44
3.7	Zeitkurve der MAFP resistenten AA-Freisetzung	45
3.8	Zeitkurve der BEL resistenten AA-Freisetzung	46
3.9	Einfluß des Primings auf die 5-LOX Aktivität in PMN	49
3.10	Effekt von Staurosporin auf die 5-LOX-Aktivität in fMLP-stimulierten PMN	50
3.11	Wirkung von DPI auf die 5-LOX-Aktivität.	51
3.12	Effekt von 5 µM BEL auf die 5-LOX-Aktivität.	52
3.13	Effekt von Propranolol und BEL auf die 5-LOX-Aktivität.	54
3.14	Einfluß von fMLP auf die [Ca ²⁺] _i in PMN	56
3.15	Wirkung von MAFP auf die [Ca ²⁺] _i in PMN	58
3.16	Einfluß von BEL und Propranolol auf die [Ca ²⁺] _i in PMN	60
3.17	Wirkung von 12-epi-SLD auf die [Ca ²⁺] _i in PMN	61
4.1	Die Wirkung der verwendeten Inhibitoren der cPLA ₂ und PLD	64
4.2	Die Wirkung der Inhibitoren der PLA ₂ und PLD auf die [Ca ²⁺] _i	66
4.3	Der Effekt von DPI und Staurosporin auf die LTB ₄ -Synthese	68

Tabellenverzeichnis

1.1	Beispiele von Effektoren der G-Proteine	9
1.2	Gruppe der Phospholipasen A ₂ mit Histidin im katalytischem Zentrum	15
1.3	Gruppe der Phospholipasen A ₂ mit Serin im katalytischem Zentrum	16
3.1	Effekt verschiedener Inhibitoren des Phospholipidstoffwechsels auf die Freisetzung von AA in fMLP-stimulierten PMN.	43
3.2	Verteilung der ¹⁴ C-Gesamtaktivität in PMN nach fMLP-Stimulierung	47
3.3	Effekt von Propranolol auf die AA- und LTB ₄ -Produktion	53
3.4	Die Veränderung der [Ca ²⁺] _i nach fMLP-Stimulierung in PMN	57
3.5	Effekt von DPI auf die Superoxidanionenfreisetzung.	62
3.6	Effekt von 12-epi-SLD auf die O ₂ ⁻ -Freisetzung	62

Abkürzungsverzeichnis

5-HETE	5-Hydroxyeicosatetraensäuren
5-HPETE	5-Hydroperoxyeicosatetraensäure
12-epi-SLD	12-epi-Scalaradial
15-HETE	15-Hydroxyeicosatetraensäuren
15-HPETE	15-Hydroperoxyeicosatetraensäure
AA	Arachidonsäure (all-cis-5,8,11,14-Eicosatetraensäure)
AACOCF ₃	Arachidonyltrifluoromethylketon
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AM	Acetoxymethylester
ATFK	Arachidonyltrifluoromethylketon
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BEL	Bromoenollakton
BPI	Bakterielles durchlässigkeitssteigerndes Protein
BSA	Rinderserumalbumin
[Ca ²⁺] _i	Freie intrazelluläre Kalziumkonzentration
cAMP	Cyklisches Adenosinmonophosphat
CHO	Chinesische ovarielle Hamsterzellen
CSF	Koloniestimulierende Faktoren
cPLA ₂	Cytosolische Phospholipase A ₂
cpm	Zählimpulse pro Minute
DAG	1,2-Diacylglycerin
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPI	Diphenyliodonium
ER	Endoplasmatisches Retikulum
fMLP	N-Formyl-L-Methionin-L-Leucin-L-Phenylalanin
FPR	N-Formyl-Peptid-Rezeptor
GEF	Guaninnucleotid austauschfaktor
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GIRK	G-Protein gekoppelter einwärtsgerichteter Kaliumkanal

G-Protein	GTP-bindendes Protein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GP	Glycerinphosphat
HOCl	Hypochlorsäure
IL-1	Interleukin 1
IL-8	Interleukin 8
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
iPLA ₂	Kalziumunabhängige Phospholipase A ₂
LTA ₄	Leukotrien A ₄
LTB ₄	Leukotrien B ₄
MAFP	Methyl-Arachidonyl-Fluorophosphat
MAP	Mikrotubuliassoziierte Proteinkinasen
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
N-Ac-S-Ge-Ge-Cystein	N-Acetyl-S-Gernayl-Geranyl-L-Cystein
NAD	Nikotinamidadenindinucleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)
NDGA	Nordihydroguaiaretinsäure
O ₂ ⁻	Superoxidanionen
PA	Phosphatidsäure
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PAP	Phosphatidphosphorylase
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Phosphatidylinositol
PIP	Phosphatidylinositol-4-phosphat
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMN	Polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PtdIns	Phosphatidylinositol
PS	Phosphatidylserin
RACK	Rezeptor für aktivierte C-Kinase
SB 203347	2-(2-(3,5-bis-(trifluoromethyl)sulfonamido)-4-trifluoromethyl-phenoxy) Benzoessäure
SD	Standardabweichung

SERCA	Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen Retikulums
SOD	Superoxiddismutase
sPLA ₂	Sekretorische Phospholipase A ₂
TBS	Tertbutyldimethylsilyl
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRP-Kanal	Transienter Rezeptorpotentialkanal