

# 1 Einleitung

Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) ist ein wichtiger proinflammatorischer Mediator, der in polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) produziert wird und in diesen Zellen besonders starke chemotaktische Aktivität aufweist. Er stellt einen zentralen Faktor bei der Rekrutierung und Aktivierung von PMN in Entzündungsreaktionen dar.

PMN besitzen eine Vielzahl von Rezeptoren, die essentiell für den Vorgang des Primings und zur Aktivierung von Zellfunktionen sind. Einer von diesen ist der Formyltripeptidrezeptor (FPR), der sowohl Chemotaxis als auch die Aktivierung der Zellen vermittelt. Es ist bekannt, daß hierbei die LTB<sub>4</sub>-Synthese nur wenig angeregt wird, obwohl sowohl die Freisetzung von Arachidonsäure (AA) als auch die intrazelluläre Kalziumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) stark erhöht werden, beides Faktoren, die für die LTB<sub>4</sub>-Formation gebraucht werden.

AA wird durch die Phospholipasen A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) und die Phospholipase D (PLD) freigesetzt, wobei diese Entzündungsmediatoren in unterschiedlichem Maße beteiligt sind.

In der vorliegenden Arbeit werden zum einen die verschiedenen PLA<sub>2</sub> in PMN nachgewiesen, zum anderen die Rolle der verschiedenen PLA<sub>2</sub> und der PLD in N-Formyl-L-Methionin-L-Leucin-L-Phenylalanin (fMLP)-stimulierten PMN mittels Inhibitoren des Phospholipidstoffwechsels untersucht. Als weiters werden die Gründe der geringen LTB<sub>4</sub>-Synthese unter fMLP, die im starken Kontrast zu der nicht-rezeptor-gebundenen Aktivierung durch Calciuminophore A23187 stehen, analysiert. Besonders eingegangen wird auf die Fragestellung, welches der limitierende Faktor der 5-LOX-Aktivität darstellt.

Für einen Einstieg in diese Vorgänge werden folgende Themen erläutert:

- Der PMN,
- die Funktion der PMN in Entzündungsreaktionen,
- Aktivatoren der PMN,
- die intrazelluläre Signaltransduktion,
- der Aufbau und die Bedeutung der PLA<sub>2</sub> und
- der AA-Stoffwechsel.

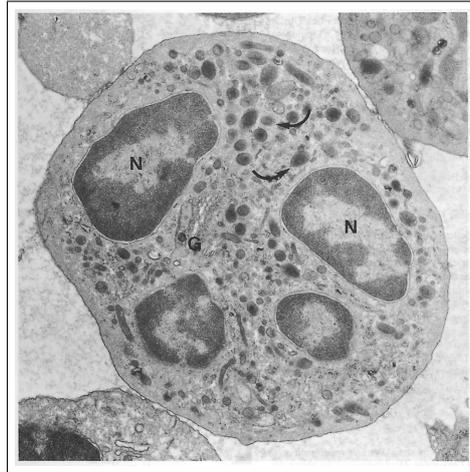


Abbildung 1.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines PMN. N = Zellkern, G = Golgi-Apparat. Die Pfeile weisen auf spezifische neutrophile Granula. Vergr. 15 000-fach, (Abbildung aus [158])

## 1.1 Der humane polymorphkernige neutrophile Leukozyt

PMN sind mit 40–65% die häufigsten weißen Blutkörperchen im menschlichen Körper. Sie zirkulieren nur wenige Stunden (8–20h) mit der Hauptfunktion, Bakterien, Parasiten, Viren und Pilze zu eliminieren, bevor diese sich vermehren und ausbreiten können; sie sind also Killerzellen der Immunabwehr [190, 176].

Granulozyten und Monozyten entstehen durch Teilung und Differenzierung aus gemeinsam determinierten Stammzellen im Knochenmark. Die Generationszeit der aus den Stammzellen hervorgehenden Myeloblasten dauert etwa 16 Stunden, die der Promyelozyten und Myelozyten ist mit 20 bzw. 34 Stunden etwas länger. Im Stadium der Promyelozyten ist eine längere Verweildauer möglich, so daß bei vermehrtem Bedarf durch eine verstärkte mitotische Aktivität eine schnelle Bereitstellung von Myelozyten erfolgen kann. So ist im Falle einer Entzündung eine Steigerung bis zur zehnfachen Konzentration möglich. Die nicht mehr teilungsfähigen Myelozyten bilden zusammen mit denen aus ihnen durch Zellreifung entstandenen Metamyelozyten stabkernige und segmentkernige Granulozyten. Sie befinden sich für ca. 6 Tage in diesem Reifungskompartiment. Die Entwicklung funktionsfähiger reifer PMN aus Stammzellen nimmt ca. 10 Tage in Anspruch [85] (siehe Abbildung 1.1).

Die amöboid beweglichen PMN sind nach dem Verlassen des Knochenmarks in zwei Gruppen geteilt, die eine bildet als wandständige Gruppe den marginalen Pool, während die andere frei im Blut zirkuliert. Bei verschiedenen Reizen wie Streß oder Entzündungsreaktionen kommt es durch Ablösung des marginalen Pools zur Verteilungsleukozytose. Nach einer Verweildauer von 10–27 Stunden wandern die PMN durch Endothelporen ins Gewebe und können dort als

fremd erkannte Partikel durch Endozytose aufnehmen und durch zahlreiche Enzyme verdauen. Nach ihrem Einsatz werden sie durch das retikuloendotheliale System vor allem in der Leber und der Milz abgebaut [85].

## 1.2 Die Rolle der PMN in Entzündungsreaktionen

Die im Blut zirkulierenden PMN befinden sich im inaktiven Zustand. Unterschiedliche Stimuli wie z.B. der Tumornekrosefaktor  $\text{TNF-}\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende-Faktor (GM-CSF) und Lipopolysaccharide verursachen einen dramatischen Anstieg der Zellantwort. Dies erfolgt in mehreren Schritten, um körpereigene Zellen vor der nicht spezifischen Aktivität der PMN zu schützen, denn die Enzyme dieser Zellen, die zur Abwehr körpereigener Organismen dienen, können auch körpereigene Zellen schädigen. Es vollzieht sich ein morphologischer Wandel. Die Zellen werden polarisiert, nehmen eine amöboide Form an und bilden Pseudopodien aus. Zugleich bewegen sich zytoplasmatische Granula auf die Zellmembran zu und fusionieren mit ihr. Während dieses Prozesses kommt es zur vermehrten Bereitstellung von Rezeptoren und anderen Proteinen auf der Zelloberfläche. Dieser Vorgang wird als „Priming“ beschrieben [51]. Unter Priming versteht man eine Konditionierung der Zellen, so daß ein anderer Stimulus eine verstärkte Aktivität der Zellen hervorrufen kann. Es kommt zu einer vermehrten Produktion von Superoxidanionen ( $\text{O}_2^-$ ) und zur erhöhten Freisetzung von Lipidmediatoren wie AA und  $\text{LTB}_4$ , zudem wird die PLD-Aktivität gesteigert [35]. So ist der PMN in der Lage, geringe Veränderungen in seiner Umgebung zu erfassen, die durch die Invasion pathogener Keime verursacht worden sind. Die effiziente Phagozytose dieser pathogenen Keime ist durch mehrere Schritte geregelt (Abbildung 1.2):

- Margination: Die im Blut zirkulierenden Zellen werden wandständig.
- Diapedese: Die PMN verlassen die Blutbahn, indem sie sich durch Endothellücken der Gefäße hindurchdrängen [146].
- Chemotaxis: Die Zellen wandern, gesteuert durch chemotaktische Reize, ins Gewebe ein [176].
- Opsonierung: Die PMN müssen die pathogenen Organismen als fremd erkennen. Hierbei spielen vor allem Opsonine eine Rolle (z.B. Antikörper, Komplementfaktoren, Akut-Phase Proteine oder Fibronektin). Die Opsonine sitzen an der Membranhülle. Die PMN besitzen Rezeptoren für Teile dieser Proteine und können die pathogenen Organismen so an sich binden.
- Endozytose: durch Adsorption und Ingestion wird das Bakterium in ein Phagosom eingeschlossen.
- Phagozytose: Nach dem Einschluß beginnt der zytotoxische Prozeß. Beteiligt sind hier

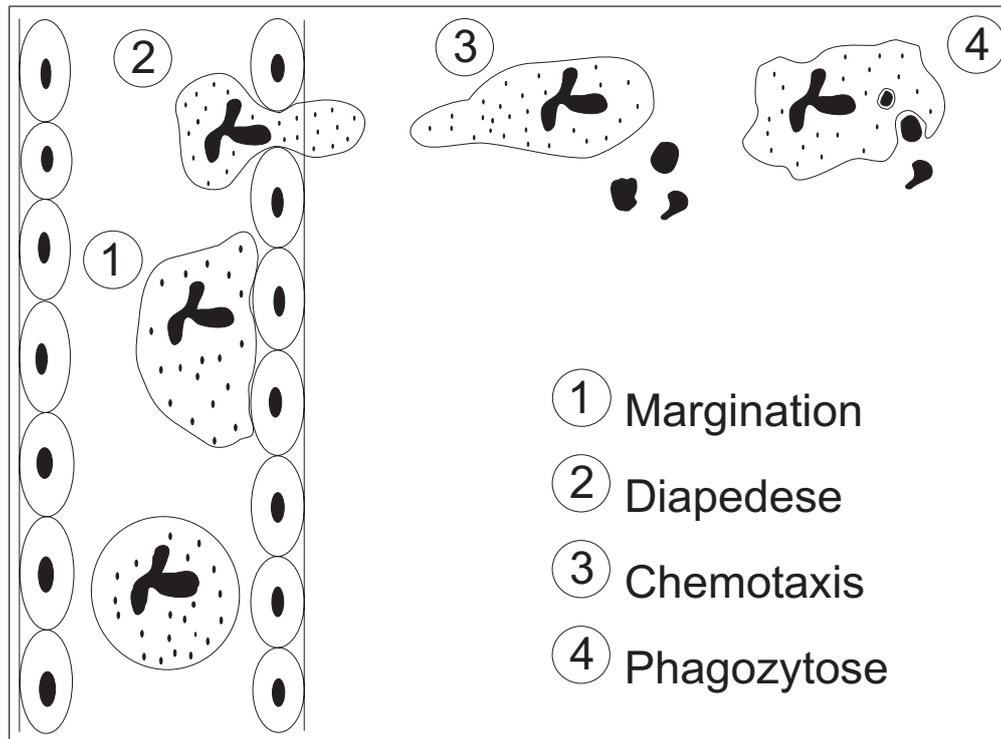


Abbildung 1.2: Die einzelnen Schritte der Phagozytose, siehe Kapitel 1.2.

die Plasmamembran und die zytoplasmatischen Granula. Über Oberflächenrezeptoren werden durch intrazelluläre Botenstoffe direkt oder indirekt spezifische Enzymsysteme aktiviert, die erstens zum „Respiratory Burst“ und zweitens zur Degranulation der Vesikel führen. Als „Respiratory Burst“ wird die explosionsartige Zunahme des oxidativen Stoffwechsels bezeichnet. Ausgelöst wird er durch eine in der Plasmamembran enthaltene NADPH-Oxidase, die die  $O_2^-$ -Produktion katalysiert. Es entstehen eine Reihe von Sauerstoffmetaboliten mit breiten antimikrobiellen Eigenschaften [19]. Die Oxidase besteht aus drei Komponenten, die in der Plasmamembran, im Zytoplasma und auf Membranen einiger Granula lokalisiert sind. Während der Phagozytose werden diese Komponenten zu einem Aktiv-Enzym-Komplex in der Zellmembran vereinigt. Dieser Komplex bildet reaktive Oxidanzien, die zu der Vesikelmembran, welche den pathogenen Keim umgibt, gebracht werden [51]. Sie führen zur Abtötung des pathogenen Organismus (siehe Abbildung 1.3).

Die zytoplasmatischen Granula bilden die zweite Säule der Abwehr. Sie enthalten eine Reihe von zytotoxischen Proteinen wie z.B. Proteasen, hydrolysierende Enzyme und Peroxidasen, die nach abgelaufenem „Respiratory Burst“ die pathogenen Keime meist vollständig abbauen können [190, 5].

- Rekrutierung von anderen Blutzellen: Wenn die eingewanderten PMN den Keim nicht

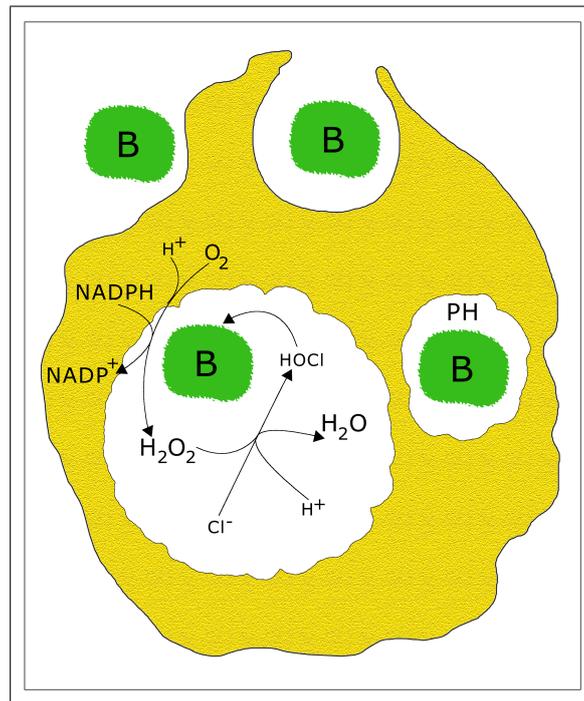


Abbildung 1.3: „Respiratory Burst“: Durch Adsorption und Ingestion wird das Bakterium (B) in ein Phagosom (PH) eingeschlossen. Durch fusionierende Lysosomen werden hydrolytische Verdauungsenzyme und Myeloperoxidase in das Phagosom eingebracht. Die Peroxidase katalysiert eine Reaktion, bei der aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Cl<sup>-</sup> die aggressive Hypochlorsäure (HOCl) gebildet wird, durch die das Bakterium abgetötet wird, siehe Kapitel 1.2.

eliminieren können, werden proinflammatorische Moleküle oder andere immunologische Stimulanzen freigesetzt, die zur Aktivierung weiterer Abwehrzellen führen.

### 1.3 Aktivatoren der PMN

Die meisten Aktivatoren der PMN wirken über die Bindung an Rezeptoren der Plasmamembran. Es sind zur Zeit fünf physiologische Hauptaktivatoren bekannt:

- LTB<sub>4</sub>
- Komplementfaktor C5a
- PAF
- Cytokine

- fMLP

Um einen Überblick über den Rezeptorstatus der PMN zu bekommen, wird kurz auf die fünf Aktivatoren eingegangen. In dieser Arbeit wird hauptsächlich die Funktion der PMN nach Stimulation mit fMLP untersucht.

### 1.3.1 LTB<sub>4</sub>

LTB<sub>4</sub> entsteht auf dem Lipoxygenaseweg aus AA. Es sind mehrere Lipoxygenasen bekannt, die jeweils in verschiedenen Zelltypen vorhanden sind. Sie unterscheiden sich in ihrer Wirkung durch die Oxygenierung unterschiedlicher C-Atome der AA (siehe Kap. 1.6.1).

In PMN liegt die 5-Lipoxygenase (5-LOX) vor. Das erste Produkt der 5-LOX ist das kurzlebige 5-HPETE, das in das instabile LTA<sub>4</sub> übergeht. In PMN, Monozyten und Makrophagen der Lunge wird LTA<sub>4</sub> zu LTB<sub>4</sub> reduziert [25].

LTB<sub>4</sub> beeinflusst die PMN in mehrerer Hinsicht: es stellt einen starken chemotaktischen Faktor dar [161]. Die Zellen reagieren schon auf LTB<sub>4</sub>-Konzentrationen im nM Bereich. Zusätzlich kann es die Haftung von PMN an Endothelzellen und die PMN-Aggregation fördern [63]. In geringem Maße stimuliert LTB<sub>4</sub> auch den „Respiratory Burst“ und die Degranulation. Hierbei werden weit höhere Konzentrationen als für die Chemotaxis gebraucht [63].

Der LTB<sub>4</sub>-Rezeptor greift über verschiedene Mechanismen in die Signaltransduktion der PMN ein. Zum einen scheint eine direkte Assoziation mit dem Zytoskelett vorzuliegen. Nachgewiesen ist eine Wirkung über G<sub>i</sub>-Proteine, durch die Chemotaxis, Degranulation und Aktinpolymerisation ausgelöst werden. Die G<sub>i</sub>-Proteine sind mit der PLC-Aktivität gekoppelt: eine Zugabe von LTB<sub>4</sub> verursacht eine Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> [76]. Zusätzlich wird durch den Rezeptor die Aktivität eines Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiports gesteuert: ein Na<sup>+</sup>-Einstrom führt zu einer Alkalisierung des Zytoplasmas [66]. Es wird angenommen, daß in LTB<sub>4</sub>-stimulierten PMN die AA-Freisetzung über die cPLA<sub>2</sub> gekoppelt ist, die iPLA<sub>2</sub> scheint unter diesen Bedingungen keine Rolle zu spielen [30].

### 1.3.2 Komplementfaktor C5a

Der Komplementfaktor C5a ist ein Produkt des Komplementfaktors C5. In PMN wird er entweder auf dem klassischen Weg durch Aktivierung der Komplementfaktoren C1-C4 oder infolge direkter Stimulation durch eine Protease wie z.B. Trypsin gebildet. Er besitzt eine starke chemotaktische Wirkung auf neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten wie auch auf Monozyten [74]. Zusammen mit C5a-des-Arg, einem Abbauprodukt von C5a, besitzt er die höchste chemotaktische Potenz in PMN [133]. Auf PMN sind ca. 100.000-300.000

Rezeptoren vorhanden. Der Rezeptor wurde geklont und ist auch auf der Zellreihe U-937 besonders zahlreich vorhanden [64]. Er ist an ein G-Protein gekoppelt [21].

### 1.3.3 PAF

Die Wirkungen von PAF in PMN bestehen in der Stimulation der AA-Freisetzung und deren Metabolisierung zu 5-, 11- und 15-HETE und LTB<sub>4</sub>. Diese Stoffe greifen wiederum selbst in den Zellmetabolismus ein. So muß zwischen einer direkten PAF-Wirkung und der sekundären Wirkung, hervorgerufen durch Produkte der PAF-Stimulation, unterschieden werden. Die unterschiedlichen Effekte von PAF in PMN bestehen in Chemotaxis, Zellaggregation und Adhärenz, Induktion des „Respiratory Burst“ und der Produktion reaktiver Oxidanzien sowie in der Degranulation [166].

### 1.3.4 Cytokine

Viele Cytokine, die in Entzündungsreaktionen entstehen, können PMN beeinflussen:

- Interleukin I: In den PMN kann besonders nach Stimulation mit GM-CSF eine erhöhte Produktionsrate festgestellt werden [56]. Die biologischen Effekte umfassen die Freisetzung von PMN aus dem Knochenmark [56], die Stimulation der Synthese und Freisetzung von Akut-Phase-Proteinen und die T- und B-Zell-Stimulation. Die Bildung von freien Radikalen und die Degranulation werden gefördert [149]. Somit wird eine Erhöhung der Zytotoxizität der Zellen erreicht [83].
- Interferon- $\gamma$ : In reifen PMN induziert Interferon- $\gamma$  die Expression von Fc- $\gamma$  R1 [34, 80], erhöht die antikörperabhängige Zytotoxizität und die Fähigkeit der Zelle, reaktive Oxidanzien zu bilden, zudem stimuliert es selektiv die Proteinbiosynthese [154, 180].
- CSF: Die Kolonie-Stimulierenden-Faktoren (CSF) stellen eine Gruppe von Cytokinen dar, die Haematopoese und Entzündungsreaktionen beeinflussen [113]. In PMN sind besonders die Faktoren GM-CSF und G-CSF von Bedeutung [90]. Die Wachstumsfaktoren sind an Tyrosinkinasen gekoppelt [178]. Durch sie erfolgt ein Priming des „Respiratory Burst“ [65, 53, 38], zudem induzieren sie eine Interleukin 8 Freisetzung [187]. GM-CSF induziert die Migration der PMN, nicht aber die Chemotaxis [72]. Die Rezeptorexpression von GM-CSF wird über die Gruppe II PLA<sub>2</sub> verstärkt [84].
- TNF- $\alpha$ : Für die PMN ist dieser Faktor besonders als Chemotaxin von Bedeutung [96]. Außerdem verursacht es die Degranulation und die Produktion von reaktiven Oxidanzien [50]. PMN, die mit TNF- $\alpha$  vorinkubiert wurden, produzieren nach fMLP-Stimulation große Mengen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [52].

- Interleukin 8: Das Interleukin 8 (IL-8), ein kleines 8-kDa Protein, ist ein sehr starkes Chemotaxin für PMN [72]. Es ist G-Protein gekoppelt [4]. Es induziert in geringem Maße die Degranulation und die Produktion reaktiver Metabolite [96]. Seine Effekte sind durch Pertussistoxin hemmbar [110].

### 1.3.5 fMLP

fMLP (N-Formyl-L-Methionin-L-Leucin-L-Phenylalanin) ist der am meisten benutzte Aktivator in vitro zur Untersuchung der rezeptorvermittelten Funktion der PMN. Es aktiviert konzentrationsabhängig viele Funktionen der Zellen. So dient es als Chemotaxin, vermittelt die Zellaggregation und die Produktion reaktiver Oxidanzien [174, 37]. Zudem führt es zu Veränderungen im Zytoskelett und zur Degranulation [131].

Die N-Formylpeptidrezeptoren (FPR) vermitteln über  $G_i$ -Proteine die fMLP-Wirkung. Sie gehören in die Familie der 7-Transmembran-Domänen-Rezeptoren. Die FPR haben ein Molekulargewicht von ca. 40 kDa. Sieben hydrophobe Segmente werden durch hydrophile Sequenzen verbunden. Sie besitzen drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen. Intrazellulär befinden sich  $G_i$ -Protein-Bindungsstellen und die Domäne der Phosphorylierungsreaktionen [141]. PMN, Monozyten sowie die Zellreihen U937 und HL60 besitzen die Rezeptoren FPR1 und FPRL1 [62]. Bei Aktivierung werden die PLC (zur Produktion von  $IP_3$  und DAG), die  $PLA_2$  (zur Freisetzung von AA), die PLD (zur Freisetzung von DAG und PA), zudem Ras und Raf [192] aktiviert. Nach Zugabe von fMLP werden unstimulierte, kugelförmige PMN auch in Abwesenheit von chemischen Aktivatoren polarisiert und nehmen an Volumen zu [147]. Diese innere Polarisierung dient der Zelle zur Orientierung und zum Folgen einer Bewegungsrichtung. Gebundene Rezeptoren werden schnell durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Die Reexpression der Rezeptoren erfolgt durch Recycling und vor allem durch Mobilisierung aus internen Zellpools, wie Experimente mit fluoreszierendem fMLP ergeben haben [67]. In unstimulierten Zellen sind etwa 6 000 Rezeptoren/Zelle vorhanden, doch ist nach Stimulation ein rascher Zuwachs auf 15 000 pro Zelle möglich [181]. Durch kalziumabhängige Prozesse erfolgt diese Aufregulation mit einer Rate von 10 000/min, wobei die Rezeptoren zum größten Teil aus den Zellpools exprimiert werden. Das Recycling der gebundenen Rezeptoren läuft wesentlich langsamer ab [135, 134].

## 1.4 Die Signaltransduktion in PMN

Die Aktivierung eines PMN erfolgt über die Rezeptoren der Plasmamembran. Die nachfolgenden Prozesse, die schlußendlich in die für PMN typischen Aktionen wie Diapedese, Adhärenz, Chemotaxis, Phagozytose, Degranulation und Aktivierung der NADPH-Oxidase enden, werden hier beschrieben.

### 1.4.1 Die G-Proteine

Fast alle rezeptorvermittelten Funktionen der PMN werden über GTP-bindende Proteine (G-Proteine) vermittelt, welche das Verbindungsstück zwischen den Plasmamembranrezeptoren und der Aktivierung der intrazellulären Enzymen wie Phospholipasen und Proteinkinasen darstellen. G-Proteine bestehen aus einer  $\alpha$ -Untereinheit mit Bindungsstelle für Guanosin-5'-Diphosphat (GDP) und Guanosin-5'-Triphosphat (GTP) sowie einer hydrophoben  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit, die das G-Protein in der Membran verankern. Jede dieser Untereinheiten gehört zu einer Genfamilie: es wurden 16  $\alpha$ -, fünf  $\beta$ - und 12  $\gamma$ -Proteine geklont. G-Proteine werden nach ihrer  $\alpha$ -Untereinheit eingeteilt. Es sind vier  $\alpha$ -Untereinheit Unterfamilien bekannt:

- $G\alpha_s$ -Proteine vermitteln die Aktivierung der Adenylatcyclase.
- $G\alpha_i$ -Proteine vermitteln die Hemmung der Adenylatcyclase sowie die Aktivierung des G-Protein gekoppelten einwärts gleichrichtenden Kaliumkanals (GIRK).
- $G\alpha_q$ -Proteine vermitteln die Aktivierung der PLC $\beta$ .
- $G\alpha_{12}$ -Proteine sind verantwortlich für die Aktivierung der Rho-Protein- Guaninnucleotidaustausch-Faktoren (GEFs).

Im inaktivem Zustand befinden sich die Membranrezeptoren in einem Zustand geringer Affinität. Nach Agonistenbindung bildet sich ein transienter Hochaffinitätskomplex des Agonisten, des aktivierten Rezeptors und des G-Proteins. GDP wird durch GTP ausgetauscht. Dies führt zu einer Dissoziation des G-Protein Komplexes in die  $\alpha$ -Untereinheit und das  $\beta\gamma$ -Dimer (siehe Abbildung 1.4). Beide Untereinheiten können Effektoren regulieren. Beispiele von Effektoren der G-Proteine sind in Tabelle 1.1 gegeben (Übersichtsartikel [138]).

G-Protein-Untereinheit	Effektoren
$G\alpha_s$	Adenylatcyclase
$G\alpha_{olf}$	Kalziumkanäle, c-Src Tyrosinkinase
$G\alpha_t$ (transducin)	$\uparrow$ cGMP Phosphodiesterase
$G\alpha_{gust}$ (gustducin)	Phosphodiesterase (bitterer und süßer Geschmack)
$G\alpha_{i1,2,3}$	$\downarrow$ Adenylatcyclase, $\uparrow$ c-Src Tyrosinkinase
$G\alpha_q, G\alpha_{11}, G\alpha_{14,15,16}$	$\uparrow$ PLC, RhoGEF
$G\beta\gamma$	GIRK Kaliumkanäle, $\uparrow$ Adenylatcyclase, $\uparrow$ PLC ( $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ )

Tabelle 1.1: Beispiele von Effektoren der G-Proteine

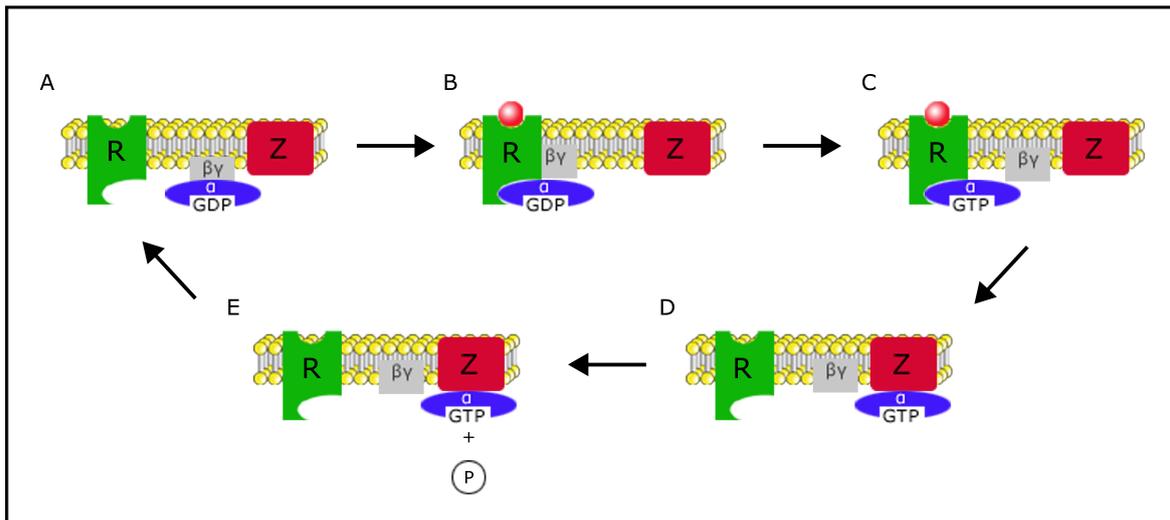


Abbildung 1.4: Die Funktion der G-Proteine: A: Ruhezustand B: Bindung des G-Proteins an den aktivierten Rezeptor C: Austausch von GDP durch GTP, Trennung der  $\alpha$  von der  $\beta\gamma$ -Untereinheit D: Aktivierung oder Hemmung des Effektors durch die GTP-tragende  $\alpha$ -Untereinheit E: Spaltung von GTP in GDP und anorganisches Phosphat (siehe Kapitel 1.4.1)

### 1.4.2 Die Phospholipase C

Viele Chemoattraktantien rufen eine rasche Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  hervor; dies erfolgt vor allem durch die PLC-Aktivität. Unter der Kontrolle von Oberflächenrezeptoren hydrolysieren die PLC Phosphatidylinositol (PtdIns), Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PIP) und Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>). Durch die Hydrolyse entstehen zwei „Second messenger“: IP<sub>3</sub> und DAG [122]. Das IP<sub>3</sub> bewirkt eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  auf ca. 1  $\mu$ M. Die Erhöhung führt zusammen mit G $\alpha$  zu einer Aktivitätssteigerung der PLC. Das andere Produkt der PLC, das DAG, aktiviert die Proteinkinase C (PKC). Zudem hemmt es die PLC-Aktivität, limitiert die Hydrolyse des IP<sub>3</sub> und drosselt die Bildung der „Second messenger“ [144].

Die bekannten Phosphatidylinositol (PI) spezifischen PLC-Moleküle werden in drei Unterfamilien eingeteilt: PLC- $\beta$ , PLC- $\gamma$  und PLC- $\delta$ . Die PLC- $\beta$ -Familie, die in vier Unterformen unterschieden werden kann (PLC- $\beta$ 1 bis PLC- $\beta$ 4), wird durch G-Proteine gesteuert [145]. PLC- $\beta$ 2 wurde vor allem in hämatopoetischen Zellen detektiert, PLC- $\beta$ 3 und PLC- $\beta$ 1 sind in vielen Zellen enthalten [145], während PLC- $\beta$ 4 vor allem in neuronalen Zellen exprimiert wird [194]. Der fMLP Rezeptor kann G<sub>i</sub>-gekoppelt die PLC aktivieren. Die  $\alpha$ -Untereinheit des G<sub>i</sub>-Proteins kann die PLC-Aktivität nicht direkt beeinflussen. Es wurde gezeigt, daß eine Stimulation der PLC- $\beta$ 2 über die  $\beta$ ,  $\gamma$ -Untereinheit erfolgt [91].

In PMN ist vor allem die PLC- $\beta$ 2 vertreten. In PMN von Mäusen, die keine PLC- $\beta$ 2 enthielten, wurde sowohl eine deutliche Reduktion der PLC-Aktivität als auch ein deutlich geringerer Kalziumefflux als Antwort auf Zellstimulation mit fMLP sichtbar. Diskutiert wird zudem ein Einfluß der PLC- $\beta$ 3. Diese PLC-Unterfamilie wird auch über  $G_{\beta,\gamma}$  reguliert. PMN von Mäusen, denen sowohl die PLC- $\beta$ 2 als auch die PLC- $\beta$ 3-Unterheit fehlten, konnten nicht auf chemotaktische Faktoren der PLC reagieren. Diese Untersuchungen zeigten, daß die Hauptfunktion in PMN die PLC- $\beta$ 2 Unterfamilie besitzt, während die PLC- $\beta$ 3 eine untergeordnete Rolle spielt [194].

### 1.4.3 Die Proteinkinase C

Die Familie der PKC umfaßt 12 Isoenzyme [188]. Sie besitzen Schlüsselfunktionen in der Signaltransduktion der PMN. Ihre Aufgabe besteht in der Phosphorylierung intrazellulärer Proteine [86]. Sie besitzen eine terminale COOH-Gruppe, die zum einen die Bindung an den Phosphatdonator und zum anderen die Bindung an Phosphataktzeptoren der Proteine ermöglicht, sowie eine NH<sub>2</sub>-Gruppe, die die Bindungsstellen für Ca<sup>2+</sup> und Phospholipide darstellt [123]. In inaktiver Form befinden sich die PKC im Zytosol. Durch DAG erfolgt die Translokation zur Plasmamembran. Eine Aktivierung der PKC führt so zum Abfall der PKC-Konzentration im Zytosol und zu einem Anstieg der Aktivität in der Plasmamembran [124]. Die spezifischen Funktionen der verschiedenen PKC werden durch Adapterproteine vermittelt. Diese Isoenzym-selektiven Proteine werden RACKs genannt (Rezeptoren für aktivierte C-Kinasen) [157]. Wichtige Funktionen der PKC in PMN sind:

- Die Aktivierung der NADPH-Oxidase: Die PKC ist an der Oxidaseaktivierung beteiligt [94], durch die Inhibition der PKC wird der „Respiratory Burst“ gehemmt [31, 47].
- Die Stimulierung der PLA<sub>2</sub>: Die Phosphorylierung der cPLA<sub>2</sub> in PMN wird von der PKC reguliert, doch wurde gezeigt, daß bei Zellaktivierung mit fMLP bei gehemmter PKC die Freisetzung von AA unverändert stattfindet [172].
- Die Aktivierung der PLD: Unter Beteiligung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> und DAG findet eine Aktivierung statt.
- Eine Beteiligung an der Apoptose der PMN: Es wurde eine Steuerung der Apoptose in PMN durch die PKC nachgewiesen [189].
- Es wird zudem eine Beteiligung an der Regulation der Membranpermeabilität diskutiert [163].

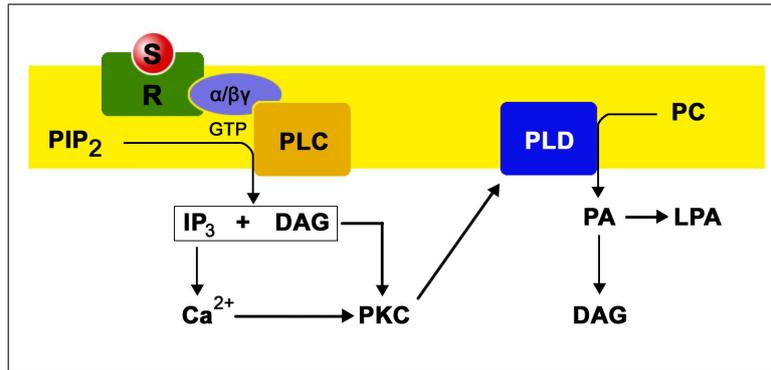


Abbildung 1.5: Modell für die Aktivierung der Phospholipase D in PMN nach Olson et al. [130]: Die PLC wird durch G-Proteine gesteuert. Sie hydrolysiert  $\text{PIP}_2$  zu  $\text{IP}_3$  und DAG. Das DAG aktiviert die PKC (siehe Kapitel 1.4.2). Die PKC transloziert vom Zytosol zur Zellmembran und aktiviert kalziumabhängig die PLD (siehe Abschnitt 1.4.3). Durch die PLD Aktivität wird PC zu PA hydrolysiert. Diese wird zu LPA und DAG abgebaut (siehe Kapitel 1.4.4). S = Stimulus, R = Rezeptor

#### 1.4.4 Die Phospholipase D

In eukaryonten Zellen liegen die Isoenzyme PLD 1 und PLD 2 vor. Eine Aktivierung erfolgt durch viele Hormone, Wachstumsfaktoren, Cytokine, Neurotransmitter, Adhäsionsmoleküle und physikalische Stimuli. Sie ist an Threonin- und Serinkinasen, Thyrosinkinasen und G-Proteine gekoppelt [162]. Als Substrat dienen der PLD die PC-Isoenzyme, die zugleich Substrate der cPLA<sub>2</sub> sind. Außerdem ist die PLD-Aktivität abhängig von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Durch Hydrolyse kommt es zur Bildung von PA [130]. In einer anschließenden Dephosphorylierungsreaktion durch die Phosphatidphosphorylase wird PA zu DAG abgebaut [101]. Die PLD ist DAG-Hauptlieferant in PMN.

Primäre Alkohole wie z.B. Propranolol können die Phosphatidphosphorylase hemmen. Es wurde gezeigt, daß durch diese Hemmung der PLC-Reaktionsweg unbeeinflusst bleibt, so daß eine Möglichkeit besteht, die DAG-Produktion der beiden Phospholipasen getrennt voneinander zu analysieren. Experimente ergaben, daß nach einer Zellaktivierung die erste geringe Produktion des DAG durch die PLC verursacht wird, während die spätere mehr ausgeprägte DAG-Produktion der PLD zuzurechnen ist [20]. So wurde vermutet, daß die initiale DAG-Produktion durch die PLC benötigt wird, um die PKC zu aktivieren, die nachfolgend den PLD-Stoffwechsel beeinflusst. Die aktivierte PLD produziert dann höhere Konzentrationen von DAG. Dieses führt zu einer verstärkten und verlängerten Aktivität der PKC (siehe Abbildung 1.5) [20].

### 1.4.5 Die Rolle der Kalziumionen in PMN

In PMN ist Kalzium sowohl an der Aktivierung der Zellfunktion wie Degranulation und Phagozytose als auch an der Aktivierung der NADPH-Oxidase beteiligt [41]. Die Messung der  $[Ca^{2+}]_i$  beruht auf der Bindung des Kalziums an  $Ca^{2+}$ -komplexierende Substanzen wie QUIN-2 oder FURA-2. Diese Substanzen ändern nach der Bindung von  $Ca^{2+}$  ihre Fluoreszenzeigenschaft und ermöglichen so die Messung der Konzentrationsänderung nach Stimulation der Zellen [184].

Die  $[Ca^{2+}]_i$  beträgt ca. 100 nM und ist somit 20.000-fach geringer als die extrazelluläre Konzentration. Die Zellen regulieren die  $[Ca^{2+}]_i$  durch endogene Chelatoren und spezialisierte Extrusionsproteine. Der Mechanismus in PMN zur Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  ist zum einen durch Ligandenbindungen an Membranrezeptoren gegeben. Nach der Bindung wird die PLC aktiviert, die  $Ins(1,4,5)P_3$  generiert, das nachfolgend Kalziumkanäle des ER öffnet [32].

Eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  wird zum anderen durch eine Aktivierung von transienten Rezeptorpotentialkanälen (TRP-Kanälen) verursacht. Die TRP-Kanäle stellen eine große Familie von Ionenkanälen dar, die durch eine gemeinsame Grundstruktur mit sechs transmembranären Domänen sowie der Permeabilität für monovalente Kationen und  $Ca^{2+}$ -Ionen gekennzeichnet sind. Die meisten TRP-Kanäle sind unspezifisch für Kationen. Sie erhöhen das Membranpotential auf ca. 0 mV und depolarisieren die Zelle somit aus ihrem Ruhepotential. So ist über ein paar Sekunden eine  $[Ca^{2+}]_i$  im Mikromolarbereich gegeben [32]. Die Regulationsmechanismen der TRP-Kanäle sind nicht vollständig geklärt. TRP-Kanäle sind von der PLC-Aktivität abhängig, wobei auch PLC unabhängige Mechanismen bekannt sind, wie z.B. die Veränderung des Zellvolumens oder Änderungen im Redoxstatus der Zelle [198].

Intrazelluläre Kalziumspeicher sind die Calciosomen. Sie sind Bestandteile des ER und besitzen eine Pumpe für die Kalziumaufnahme (SERCAs) und kalziumbindende Proteine für die Speicherung [112]. In PMN sind die Speicherproteine das Calreticulin und das kalziumabhängige Adenosintriphosphat. Es wurde gezeigt, daß eine Umverteilung dieser beiden Kalziumspeicherproteine schon in der Frühphase der Phagozytose beginnt. Es konnten stark erhöhte Konzentrationen in aktinreichen Zytoplasmaregionen gemessen werden. Durch diese Bereitstellung sichert sich die Zelle eine gezielt lokalisierte Produktion von Kalzium während der Phagozytose [169].

Bei der Aktivierung des „Respiratory Burst“ spielt Kalzium eine besondere Rolle: Ein Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  führt nicht unweigerlich zur Aktivierung der NADPH-Oxidase. Manche Agonisten wie PAF und  $LTB_4$  erzeugen eine hohe  $[Ca^{2+}]_i$  und sind schwache Aktivatoren des „Respiratory Burst“, fMLP hingegen erhöht die  $[Ca^{2+}]_i$  und löst einen schwächeren „Respiratory Burst“ aus. Der Kalziumanstieg ist nicht unbedingt erforderlich, wenn z.B. DAG in ausreichend hohen Konzentrationen gebildet wird, um die PKC zu aktivieren. Es scheint so, daß die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  nicht per se für die Aktivierung des „Respiratory Burst“ benötigt

wird, aber an der Aktivierung eines Enzyms oder eines Prozesses beteiligt ist, der zu einer Aktivierung der Oxidase führt [82].

## 1.5 Der Aufbau und die Bedeutung der Phospholipasen A<sub>2</sub>

Die Phospholipasen A<sub>2</sub> kommen in fast allen Zellen vor. Es sind Enzyme, die zelluläre Phospholipide hydrolysieren und so freie Fettsäuren und Lysophospholipide freisetzen. Sie sind teilweise selektiv für die Phospholipid-sn-2-acyl-Gruppe. Die freien Fettsäuren beeinflussen nun viele Zellfunktionen, die Lysophospholipide sind über LPA-Rezeptoren an der Zellaktivierung beteiligt [45]. Zu den hydrolysierten Phospholipiden gehören AA und Lyso-PAF. Diese präinflammatorischen Mediatoren fördern Entzündungsreaktionen und nehmen direkt an Prozessen teil, die zu Gewebsverletzungen führen. Zuerst fand man diese Lipase in Pankreassekret und Schlangengift: es wurde beobachtet, daß Lecithin von Hühnereiweiß zu freien Fettsäuren hydrolysiert werden konnte. Die Enzyme wurden isoliert und man entdeckte Proteine, die für ihre Aktivität relativ klein sind und durch viele Cystein-Disulfidbrücken innere Stabilität erlangen. Beim Vergleich stellte man eine große Homologie der beiden Enzyme fest, was durch die ähnliche Funktion der beiden Drüsen nicht verwunderlich ist. Die erste Einteilung bestand in der An- oder Abwesenheit einer kurzen Frequenz am C-Terminus, die ein im Molekül vorhandenes Cystein flankiert. So erfolgte die Zuordnung in Gruppe I oder II, die jeweils noch in Untergruppen A und B untergliedert wurden. In den letzten Jahren kamen weitere Typen hinzu. Mindestens vier kleine kalziumabhängige Phospholipasen wurden charakterisiert. Zudem fand man größere kalziumunabhängige Typen. Man integrierte die neuen Familienmitglieder in die alte Einteilung, so daß zur Zeit 11 Gruppen bekannt sind [109]. Die Vertreter unterscheiden sich teilweise erheblich hinsichtlich Molekülgröße, zellulärer Lokalisation, Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit und molekularer Charakteristika [45]. Man unterteilt die PLA<sub>2</sub> in zwei Gruppen: die einen mit Histidin, die anderen mit Serin im aktivem Zentrum.

Die Gruppen I, II, III, V, IX, X und XI sind eng miteinander verbunden. Sie teilen den gleichen Mechanismus, die sn-2 Esterbindung zu spalten. Durch die Aktivierung eines Wassermoleküls findet eine Hydrolyse statt, wobei Hydrogen an das Histidin im aktivem Zentrum bindet. Hierdurch wird eine pH-Abhängigkeit, die bei ca. 7–9 liegt, für alle Phospholipasen mit Histidin im aktiven Zentrum vorgegeben. Ein anderes Merkmal dieser Gruppen ist ein neben dem aktiven Zentrum gelegenes Aspartat. Man spricht von einer His/Asp-Dyade. Dieses Aspartat ist ein Ligand für Kalzium, welches zur Stabilisierung der cPLA<sub>2</sub> Reaktion dient. Die cPLA<sub>2</sub> enthält Histidin im katalytischen Zentrum. Ihre Aktivität erfordert Kalziumkonzentrationen im mM Bereich [165]. Die Tabelle 1.2 zeigt eine Aufstellung dieser Gruppen.

Phospholipasen A<sub>2</sub> mit Serin im aktivem Zentrum sind die Gruppen IV, VI, VII und VIII. Diese Gruppen sind nur teilweise kalziumabhängig (siehe Tabelle 1.3).

Gruppe	Vorkommen	Größe (kDa)	Disulfide (Anzahl)	Disulfid Brücken	C-term. Ende	Chromosom		Archetyp Enzym	NCVI Protein Accession Nr.
						Mensch	Maus		
I	A Gift der Kobra	13-15	7	11-77	keine	N/A	N/A	Kobra	P15445
B	Säuger (Pankreas)	13-15	7	11-77	keine	12q23-24 (58)	5 (33)	Mensch	NP_000919
II	A humane Synovial- flüssigkeit, Thrombozyten der Klapperschlange, Gift der Viper	13-15	7	50-137	7 res.	1p34-36 (26)	4 (59)	Mensch	NP_000291
B	Schlangengift der Gaboon	13-15	6	50-137	6 res.	N/A	N/A	Viper	PSBGA
C	Ratten/ Maus (Testis)	15	8	50-137, 86-92	7 res.	1p34-36 (26)	4 (26)	Maus	NP_032894
D	Mensch/Maus (Pankreas und Milz)	14-15	7	50-137	7 res.	1p36.12 (60)	4 (61)	Mensch	NP_036532
E	Mensch/Maus (Gehirn, Herz, Uterus)	14-15	7	50-137	7 res.	1p36(62)	4 (33)	Mensch	AAF36541
F	Maus (Testis/Embryo)	16-17	7	50-137	30 res.	N.D.	4 (33)	Maus	AAF04500
V	Säuger (Herz, Lunge, Ma- krophagen)	14	6	keine	keine	1p34-36 (26)	4 (26)	Mensch	NP_000920
X	Mensch (Milz, Thymus, Leukozyten)	14	8	11-77, 50-137	8 res.	16p12-13.1 (63)	16 (33)	Mensch	NP_003552
III	Biene, Eidechse, Skorpion, Mensch	15-18	5	N/A	N/A	22q (64)	N.D.	Bienenhonig	P00630
IX	Schnecken Gift	14	6	N/A	N/A	N/A	N/A	Seeschnecke	AAB33555
XI	A Grüner Reis	12,4	6	N/A	N/A	N/A	N/A	Reis	CAB40841
B	Grüner Reis	12,9	6	N/A	N/A	N/A	N/A	Reis	CAB40842

Tabelle 1.2: Tabelle der bisher bekannten Phospholipasen A<sub>2</sub> mit Histidin im katalytischem Zentrum. Tabelle entnommen aus [165].

Gruppe	Vorkommen	Synonym	Größe (kDa)	Ca <sup>2+</sup> -Effekte	Charakteristika	humanes Chromosom	humane NCBI Accession Nr.
IV A	Humane U937 Zellen, Thrombozyten RAW 264.7, Rattenmilien	cPLA <sub>2</sub> α	85	< μM Membrantranslokation	C2 Domäne, α/β-Hydrolase Regulation der Phosphorylierung	1q25 [65]	P47712
B	Mensch (Pankreas, Leber, Herz, Gehirn)	cPLA <sub>2</sub> β	114	< μM Membrantranslokation	C2 Domäne, α/β-Hydrolase	15 (66)	AAD32135
C	Mensch (Herz, Skelett, Muskel)	cPLA <sub>2</sub> γ	61	keine	α/β-Hydrolase	19(66)	AAC32823
VI A-1	P388D <sub>1</sub> Makrophagen, CHO	iPLA <sub>2</sub> / iPLA <sub>2</sub> -A	84-85	keine	kurze Verbindung	22q13.1 (66,27,67)	AAD41722
A-2	humane B-Lymphozyten, Testis	iPLA <sub>2</sub> -B	88-90	keine	lange Verbindung	22q13.1 (66,27,67)	NP_03551
B	Mensch (Herz, Skelett, Muskel)	iPLA <sub>2</sub> γ / iPLA <sub>2</sub> -2	88	keine	Membranbindung	7q31 (68,70)	BAA94997
VII A	Mensch, Maus, Schwein, Rinderserum	PAF-AH	45	keine	Sekretion, α/β-Hydrolase, Ser/His/Asp Triade in VIIA und VIIB intrazellulär	N.D.	Q13093
B	Mensch, Rind (Leber, Niere)	PAF-AH (II)	40	keine		N.D.	Q99487
VIII A	Mensch (Gehirn)	PAF-AHb α <sub>1</sub> (Untereinheit eines Trimers)	26	keine	intrazellulär, G-Protein-verbunden, Ser/His/Asp Triade aktiv als Heterodimer oder Homodimer	N.D.	Q15102
B	Mensch (Gehirn)	PAF-AHb α <sub>2</sub> (Untereinheit eines Trimers)	26	keine		11q23 (69)	Q29459

Tabelle 1.3: Tabelle der bisher bekannten Phospholipasen A<sub>2</sub> mit Serin im katalytischem Zentrum. Tabelle entnommen aus [165].

Funktionen dieser Familie sind unter anderen:

- Verdauung von Nahrungsmittel und Abfangen zellschädigender Stoffe,
- Freisetzung von Fettsäuren während Signaltransduktion und Entzündungsreaktionen,
- Vermittlung von Signaltransduktionsprozessen und Beeinflussung der freien Fettsäuren der Zellmembran und
- Inaktivierung von PAF und Beseitigung von oxidierten Phospholipiden durch spezifische Reaktionen mit kleinen sn-2 Acylgruppen.

In PMN scheinen drei dieser PLA<sub>2</sub> Isoenzyme vertreten zu sein, so daß auf diese Enzyme besonders eingegangen wird. Es handelt sich hierbei um die Gruppe IVa cPLA<sub>2</sub>, die Gruppe VIa iPLA<sub>2</sub> und Typ II sPLA<sub>2</sub>.

### 1.5.1 Die Gruppe IVa cPLA<sub>2</sub>

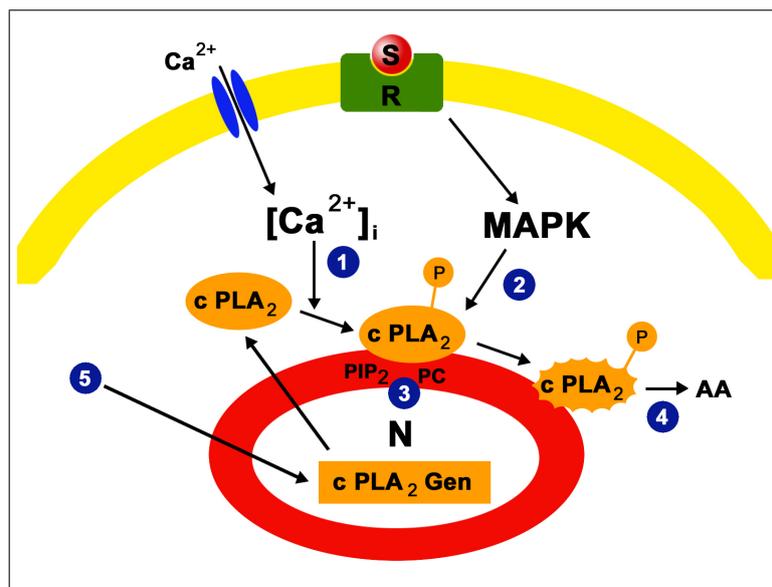


Abbildung 1.6: Modell für die Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> in stimulierten Zellen nach Hirabayashi et al. [79]: 1: Translokation, 2: Stabilisierung, 3: Phosphorylierung, 4: Freisetzung von AA, 5: Expression; S = Stimulus, R = Rezeptor, N = Nucleus (siehe Kapitel 1.5.1).

Die cPLA<sub>2</sub> (85 kDa PLA<sub>2</sub>) in PMN ist heute bekannt als Gruppe IVa cPLA<sub>2</sub>. Sie ist selektiv für die Phospholipid-sn-2-acyl-Gruppe und spielt eine große Rolle bei der AA-Freisetzung [89]. Im aktiven Zentrum ist eine Serinesterase enthalten. Das aktivierte Enzym katalysiert die Hydrolyse der Esterbindung in der C<sub>2</sub>-Position der Phospholipide. Dabei entstehen freie

Fettsäuren und das entsprechende 2-Lyso-Phospholipid. Durch diesen Vorgang wird eine gezielte topographisch lokalisierte Hydrolyse der Phospholipide erreicht [136]. In inaktiven Zellen befindet sich die cPLA<sub>2</sub> in der zytosolischen Fraktion. Wird sie jedoch aktiviert, beginnt die Translokation zur Kernmembran und zum ER [140].

Die cPLA<sub>2</sub> wird durch verschiedenste Stimuli aktiviert. Hierzu gehören Hormone, Neurotransmitter und Cytokine. Zudem können physikalische Reize und Streßfaktoren wie Oxidation, Hyperglykämie und UV-Licht zu einer Stimulation führen. Eine Veränderung der mRNA-Konzentration der cPLA<sub>2</sub> kann durch verschiedene Cytokine wie IL-1, TNF- $\alpha$ , oder Interferon- $\gamma$  verursacht werden [79]. MAP-Kinasen verursachen eine maximale Aktivität der cPLA<sub>2</sub>.

Nach einem Modell von Hirabayashi et al. [79] wird die Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> durch rezeptorvermittelte Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  verursacht. Die cPLA<sub>2</sub> transloziert durch den Kalziumanstieg vom Zytoplasma zum ER. Faktoren wie PC und PIP<sub>2</sub> stabilisieren die Verankerung der cPLA<sub>2</sub> an die Membranphospholipide. Gleichzeitig führt die MAPK zur Phosphorylierung der cPLA<sub>2</sub> mit damit verbundener Erhöhung der katalytischen Aktivität. Durch die Stimulation des an die Membran gebundenen Enzyms kommt es zur Freisetzung von AA. Eine Regulation der cPLA<sub>2</sub> Expression wird durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und Onkogene vorgenommen (siehe Abbildung 1.6). Ein Modell geht davon aus, daß die PKC eine Kinasekaskade triggert, die im Endeffekt die MAP-Kinasen aktiviert und damit zu einer Phosphorylierung der cPLA<sub>2</sub> führt [177]. Da jedoch auch bei Hemmung der PKC AA ausgeschüttet wird, kann dies nur einer von mehreren Stoffwechselwegen sein.

Die Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> ist kalziumabhängig, wobei Kalziumkonzentrationen im nM-Bereich notwendig sind. Im Gegensatz zur sPLA<sub>2</sub> wird das Kalzium nicht für die katalytische Aktivität benötigt, doch wird es zur Bindung der cPLA<sub>2</sub> an Membranen oder Vesikel gebraucht [33]. Der Amino-Terminus der cPLA<sub>2</sub> enthält eine kalziumabhängige Lipidbindungsdomäne (CaLB), die eine Membranbindung ermöglicht [88].

Studien haben gezeigt, daß PIP<sub>2</sub> die Bindung der cPLA<sub>2</sub> an Lipidvesikel fördert und die Enzymaktivität kalziumunabhängig steigert. Dies läßt den Schluß zu, daß cPLA<sub>2</sub> direkt mit PIP<sub>2</sub> agieren kann und PIP<sub>2</sub> eine direkte Bindungsstelle für cPLA<sub>2</sub> besitzt. Eine PIP<sub>2</sub>-Domäne wurde jedoch bisher in der cPLA<sub>2</sub>-Sequenz nicht identifiziert [115].

Als Inhibitor der cPLA<sub>2</sub> ist MAFP (Methyl-Arachidonyl-Fluorophosphat) bekannt. Dies ist ein irreversibler Hemmer der Phospholipasen, die Serin enthalten. Es kann dabei jedoch nicht zwischen iPLA<sub>2</sub> und cPLA<sub>2</sub> unterscheiden [100].

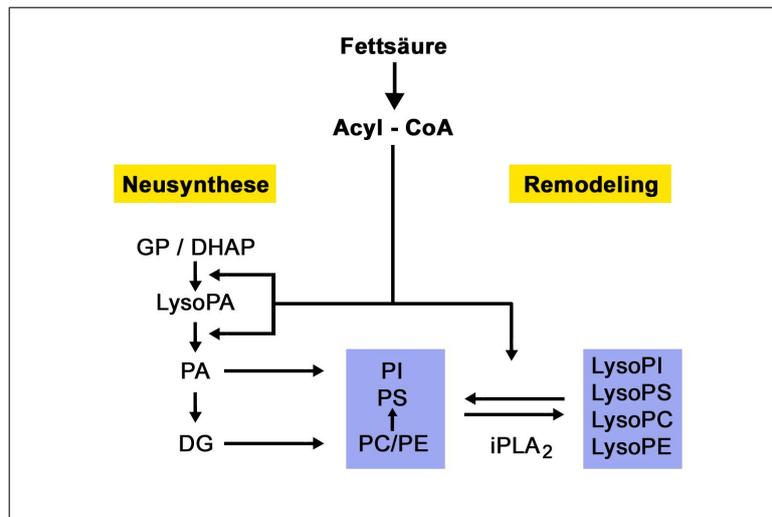


Abbildung 1.7: Der Lands Zyklus nach Belsinde et al.. Links wird die Neusynthese der Phospholipide mit der Aktivierung der Fettsäuren durch Veresterung mit Acyl-CoA gezeigt. Hierbei wird Acyl-CoA mit GP und DHAP eingebaut. Es entstehen zunächst Lysophosphatidsäuren und nachfolgend durch die Acyl-CoA Acyltransferase PA. Diese wird zu PI oder zu DAG abgebaut. DAG ist die Vorstufe der PC und der PE, welche auch PS bilden. Rechts wird die Beteiligung der iPLA<sub>2</sub> am Phospholipidremodeling gezeigt. Präexistente Phospholipide werden von der Gruppe VIa iPLA<sub>2</sub> gespalten, wobei 2-Lysophospholipide entstehen, die dann mit einer anderen freien Fettsäure verbunden werden können, um ein neues Phospholipid zu bilden. Dieses ist im Gegensatz zur Neusynthese der energieärmere Stoffwechselweg (siehe Kapitel 1.5.2) [12].

### 1.5.2 Die Gruppe VIa iPLA<sub>2</sub>

Die klassische kalziumunabhängige Phospholipase A<sub>2</sub> wird als Gruppe VIa iPLA<sub>2</sub> bezeichnet. Sie wurde anfänglich in P388D<sub>1</sub>-Zellen, einer makrophagenähnlichen Zellreihe, untersucht. Die cDNA wurde mittlerweile in vielen Zellen nachgewiesen und geklont, wie in CHO-Zellen, P388D<sub>1</sub>-Zellen und humanen B Lymphozyten [6]. Die iPLA<sub>2</sub> hat ein apparentes Molekulargewicht von 85–88 kDa und bildet ein Homotetramer. Es besitzt sowohl Lysophospholipase- wie auch Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität und ist an komplexen Interaktionen mit Zelloberflächen beteiligt [99]. Es zeigt eine nicht sehr ausgeprägte Substratpräferenz, hydrolysiert sowohl sn-2 Arachidon- wie auch sn-2 Palmitinsäure [12]. Im katalytischen Zentrum befindet sich Serin [165]. Die Gruppe VIa liegt in zwei Isoenzymen vor: VIa-1 und VIa-2. Die subzelluläre Lokalisation dieser Isoenzyme wurde in einigen Zelltypen untersucht. In P388D<sub>1</sub>-Zellen ist die iPLA<sub>2</sub> Aktivität in der zytosolischen Fraktion höher als in der membranösen Fraktion, doch weitere Studien sind notwendig, um die exakte Lokalisation zu bestimmen [99].

Die Aktivität der iPLA<sub>2</sub> wird durch die Anwesenheit von ATP und anderen Nukleosiddiphosphaten oder Nukleosidtriphosphaten gesteigert, wobei Untersuchungen in P388D<sub>1</sub>-Zellen ergeben haben, daß das ATP nicht die iPLA<sub>2</sub> aktiviert, sondern vielmehr vor einem Aktivitätsverlust schützt [99]. Studien haben ergeben, daß die Gruppe VIa-1 von ATP nicht beeinflusst wird, während Gruppe VIa-2 in Anwesenheit von ATP eine 2–3,5-fache Steigerung der Aktivität aufweist [165].

Die Funktion der iPLA<sub>2</sub> besteht in der Vermittlung des Phospholipidremodelings. Phospholipidremodeling ist ein Zyklus des Abbaus und der Neubildung von Membranphospholipiden, dem sogenannten Lands Zyklus. Präexistente Phospholipide werden hierbei von Gruppe VIa iPLA<sub>2</sub> gespalten, wobei 2-Lysophospholipide entstehen, die dann mit einer anderen freien Fettsäure verbunden werden können, um ein neues Phospholipid zu bilden [12]. Dieses ist im Gegensatz zur Neusynthese von Phospholipiden der energieärmere Stoffwechselweg. Die Neusynthese beginnt mit der Aktivierung der Fettsäuren durch Veresterung mit Acyl-CoA. Hierbei wird Acyl-CoA mit Glycerinphosphat (GP) und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) eingebaut. Es entstehen Lysophosphatidsäuren und im nächsten Reaktionsschritt durch die Acyl-CoA Acyltransferase PA. Diese wird zu PI oder zu DAG abgebaut. DAG ist die Vorstufe der PC und der PE, welche auch PS bilden (siehe Abbildung 1.7).

Die Funktion des Phospholipidremodelings der Gruppe VIa iPLA<sub>2</sub> wurde in vielen Untersuchungen belegt: Die Inhibition der mRNA der iPLA<sub>2</sub> in PD388D<sub>1</sub>-Zellen ergab eine ca. 50%-ige Reduktion der aufgenommenen AA in die Phospholipidfraktion [7]. Diese verminderte Aufnahme der freien Fettsäure wurde begleitet von einer 55–60%-igen Reduktion der iPLA<sub>2</sub> Proteine und einer 75–80%-igen Reduktion der iPLA<sub>2</sub> Aktivität [7]. Die Ergebnisse stützen frühere Studien, in denen der Gruppe VIa iPLA<sub>2</sub> Inhibitor Bromoenollakton (BEL) in P388D<sub>1</sub>-Zellen eingesetzt wurde [10]. Hierbei wurde eine Verminderung der inkorporierten

AA um ca. 60% erreicht. Untersuchungen in HEK293-Zellen ergaben, daß die Freisetzung von AA nach Transfektion der Zellen mit Gruppe VIa PLA<sub>2</sub> nicht zu einer Prostaglandinproduktion führte, sondern dem Phospholipidremodeling diene [118]. So wurde gezeigt, daß die iPLA<sub>2</sub> ein wichtiger Mediator des Phospholipidremodelings darstellt.

### 1.5.3 Die Gruppe IIa sPLA<sub>2</sub>

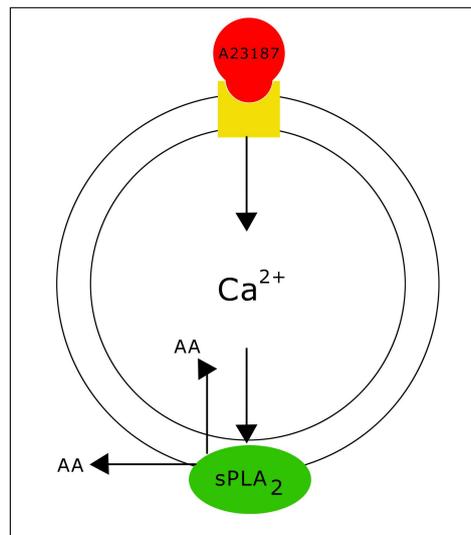


Abbildung 1.8: Stimulation der sPLA<sub>2</sub> durch Ca<sup>2+</sup>-Ionophore A23187 (siehe Kapitel 1.5.3).

Sechs verschiedene Gruppen der sekretorischen 14 kDa Phospholipasen A<sub>2</sub> wurden in humanen Zellen geklont. Dies sind die Gruppen IB, IIA, IID, IIE, V und X sPLA<sub>2</sub>. Zwei von ihnen wurden im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen untersucht: die pankreatische Gruppe Ib sPLA<sub>2</sub> und der synoviale Typ IIA sPLA<sub>2</sub>.

- Die Gruppe IB PLA<sub>2</sub> kommt in hoher Konzentration im Pankreassekret vor. Deshalb wurde angenommen, daß ihre Funktion auf die Verdauung beschränkt sei. Es folgten Studien zur Beteiligung an der akuten Pankreatitis [185]. Untersuchungen ergaben eine geringere aber signifikante Expression in Lunge, Milz, Nieren und Ovarien, so daß weitere Funktionen möglich schienen. Neben der Verdauung wurde eine Rolle bei der Zellproliferation, Zellmigration und Hormonausschüttung nachgewiesen [186].
- Die Gruppe IIA sPLA<sub>2</sub> fungiert als antimikrobielle Substanz, sie agiert als Akut-Phase-Protein. Das Enzym ist sehr effektiv bei der Zerstörung Gram-positiver Bakterien. Zum Durchdringen der Lipopolysaccharidhülle Gram-negativer Bakterien wird das bakterielle durchlässigkeitssteigernde Protein (BPI) als Permeabilisierungsfaktor gebraucht [29]. In Mastzellen, PMN und Makrophagen wurden Synthese und Sekretion der Typ IIA sPLA<sub>2</sub> nachgewiesen [77, 59, 148]. Man nimmt an, daß dieses Enzym als

Entzündungsmediator dient, doch wird seine Rolle noch kontrovers diskutiert [93, 117]. Außerdem wird eine Beteiligung an Zellproliferation und Apoptose vermutet [117, 103].

Die Gruppe IIa PLA<sub>2</sub> ist in hoher Konzentration in entzündetem Gewebe vorhanden. In humanen eosinophilen Granulozyten wurden große Mengen des Enzyms gefunden. Während in PMN eine Konzentration von ca. 0,73 ng/10<sup>2</sup> Zellen vorliegt, geht man in eosinophilen Granulozyten von ca. 1,93 ng/10<sup>3</sup> Zellen aus [24]. Auch in Tränen und Synovialflüssigkeit liegt die sPLA<sub>2</sub> in hoher Konzentration vor.

Durch IL-1 und IL-6 sowie dem TNF- $\alpha$  wird die mRNA-Expression der Typ II sPLA<sub>2</sub> gesteigert, zudem auch die Synthese und Sekretion erhöht [36].

Die sPLA<sub>2</sub> ist in der Zellmembran lokalisiert. Sie zeigt eine nicht sehr ausgeprägte Substratpräferenz, hydrolysiert sowohl sn-2 Arachidon- wie auch sn-2 Palmitinsäure [12]. Untersuchungen haben gezeigt, daß die sPLA<sub>2</sub>-Aktivität Kalziumkonzentrationen im mM Bereich benötigt [29]. Diese Konzentrationen werden im extrazellulären Bereich erreicht. Es wurde eine Beteiligung des extrazellulären Kalziums an der Freisetzung von AA und Bildung von 5-LOX-Produkten in mit Ca<sup>2+</sup>-Ionophore A23187-stimulierten PMN beschrieben [156].

Es wurde vermutet, daß ein Zusammenspiel der sPLA<sub>2</sub> und der cPLA<sub>2</sub> besteht [9]. Die sPLA<sub>2</sub> ist unfähig, bei intakten Zellmembranen die Phospholipide zu hydrolysieren. Wenn jedoch die Membran durch bestimmte Mechanismen destabilisiert wurde, ist dieser Reaktionsschritt möglich [8]. Die sPLA<sub>2</sub> bindet an einen spezifischen Rezeptor oder an Heparinsulfatproteoglycane [2], hydrolysiert die Membran und führt damit zu einer AA-Freisetzung in das extrazelluläre Medium (siehe Abbildung 1.8).

In vielen Zellen spielt die sPLA<sub>2</sub> eine untergeordnete Rolle bei der Prostaglandinsynthese. In Blutplättchen z.B. ist die AA-Freisetzung und Thromboxansynthese auf die cPLA<sub>2</sub> zurückzuführen, obwohl diese Zellen die sPLA<sub>2</sub> besitzen und Thrombin zu einer Stimulation dieses Enzyms führt. Die sPLA<sub>2</sub> kann jedoch in diesen Zellen die Koagulation modulieren, indem sie den Faktor Va in einer nicht-enzymatischen Reaktion hemmt. Zudem kann sie Lipoproteine zur Freisetzung von Lysophospholipiden stimulieren, was zu einer Inhibition der Plättchenaggregation führt und andere Prozesse der Entzündungsreaktionen beeinflusst [14].

Es existieren zwei Inhibitoren der sPLA<sub>2</sub>: das 12-epi-Scalarial (12-epi-SLD) und das SB 203347 (2-(2-(3,5-bis-(trifluoromethyl)sulfonamido)-4-trifluoromethylphenoxy) Benzoesäure). Das 12-epi-SLD wurde als spezifischer Inhibitor der 14 kDa sPLA<sub>2</sub> beschrieben [107]. In Ca<sup>2+</sup>-Ionophore A23187 stimulierten PMN zeigte sich eine Inhibition der AA-Freisetzung durch SB 203347 [108].

- Die neuen Moleküle sPLA<sub>2</sub>, die Gruppen IID, IIE, V und X werden derzeit auf ihre

Beteiligung an Entzündungsreaktionen untersucht. Bisher ist wenig über ihre Funktion, Beziehung zu anderen Zellsystemen und Rolle bei Erkrankungen bekannt.

## 1.6 Der Arachidonsäurestoffwechsel

Die AA ist Ausgangssubstanz für zahlreiche Mediatorstoffe. Sie ist zum größten Teil in die Phospholipide der Zellemban eingebaut, nur ein geringer Teil liegt frei vor. Auf verschiedene Reize, insbesondere durch zellschädigende Noxen, wird sie durch Aktivierung von den PLA<sub>2</sub> freigesetzt und anschließend auf zwei Hauptwege, dem

- Cyclooxygenaseweg und dem
- Lipoxygenaseweg

über die Hydroperoxyeicosatetraensäure (HPETE) zu den verschiedenen Mediatorsubstanzen umgewandelt [152]. Alle Mediatoren werden als Eicosanoide zusammengefaßt, da sie 20 Kohlenstoffatome besitzen.

### 1.6.1 Der Lipoxygenaseweg

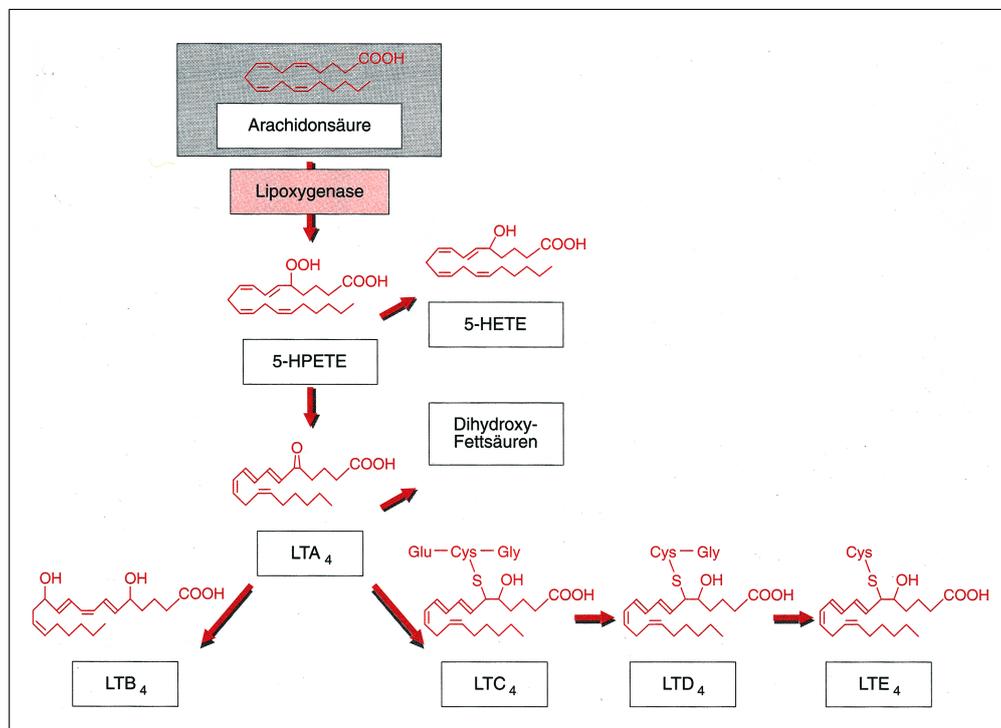


Abbildung 1.9: Der Lipoxygenaseweg ([49])

Die wichtigsten Endprodukte des Lipoxygenasewegs in PMN sind 5-HETE und LTB<sub>4</sub> (siehe Abbildung 1.9). Durch die LOX-Aktivität wird die AA zu Hydroperoxiden (HPETE und Leukotrienen) oxidiert. Drei Isoenzyme sind im menschlichen Organismus von besonderer Bedeutung: die 5-, 12-, und die 15-LOX [105]. Während die 12-LOX vor allem in Thrombozyten [125] und die 15-LOX in eosinophilen Granulozyten vorkommt [164], wurde in PMN die 5-LOX nachgewiesen [97]. Die 5-LOX ist ein Polypeptid von 80 kDA. Das zytosolische Enzym transloziert zur Zellmembran, wo es seine Aktivität in einem kalzium- und ATP-abhängigen Prozeß entfaltet [16]. Aus der 5-HPETE entsteht, katalysiert durch eine Peroxydase, die 5-HETE. Die 5-HETE wird in PMN durch Reinkorporation und Veresterung in zelluläre Lipide [170] und durch Oxidation zu 5,20-DiHETE inaktiviert [111]. Die Bedeutung von 5-HETE in PMN liegt besonders in der chemotaktischen Aktivität auf Leukozyten, Fibroblasten und Keratinozyten.

Das 5-HPETE ist zudem Ausgangssubstanz der Leukotriene. Durch Transformation, katalysiert durch die 5-LOX, entsteht das Epoxid Leukotrien A<sub>4</sub>. Die Konzentration an LTA<sub>4</sub> ist maximal 1–2 Minuten nach Stimulation erhöht und fällt dann wieder ab, da dieses Molekül instabil ist. In PMN, Monozyten und Makrophagen der Lunge wird das LTA<sub>4</sub> zu LTB<sub>4</sub> reduziert [152], während in eosinophilen Granulozyten und Mastzellen das LTA<sub>4</sub> durch Glutathion zu LTC<sub>4</sub> umgesetzt wird. Bei Stimulation der PMN mit Ca<sup>2+</sup>-Ionophore A23187 entstehen große Mengen an AA, LTA<sub>4</sub> und nichtenzymatischen Derivate des LTA<sub>4</sub>, denn die Hydrolaseaktivität in PMN ist begrenzt, so werden die größten Anteile des LTA<sub>4</sub> in nichtenzymatische Derivate abgebaut. Im Gegensatz dazu wird nach Zellstimulation mit fMLP weniger AA freigesetzt, und so kann das gebildete LTA<sub>4</sub> nahezu vollständig in LTB<sub>4</sub> abgebaut werden. Das LTB<sub>4</sub> stellt das Hauptprodukt der LOX in PMN dar. Die Metabolisierung des LTB<sub>4</sub> wird durch eine NAD<sup>+</sup>-abhängige Dehydrogenase und eine Cytochrom P<sub>450</sub>-abhängige Monooxygenase gesteuert. Es entstehen inaktive Abbauprodukte (20-COOH LTB<sub>4</sub> und 20-OH-LTB<sub>4</sub>) [26]. Zudem wird LTB<sub>4</sub> durch ein trägergekoppeltes Transportsystem in den extrazellulären Raum verschoben [95]. Die physiologische Bedeutung des LTB<sub>4</sub> in PMN wurde bereits in Kapitel 1.3.1 besprochen.

### 1.6.2 Der Cyclooxygenaseweg

Der Cyclooxygenaseweg spielt eine untergeordnete Rolle in PMN, doch die Zellen können Prostaglandin E<sub>2</sub> und Thromboxan B<sub>2</sub> produzieren (siehe Abb. 1.10). Die Cyclooxygenase benötigt nur geringe Mengen an Hydroxyprodukten. Katalysiert durch das aktivierte Enzym entsteht aus AA über 11-HPETE das Prostaglandinperoxid PGG<sub>2</sub>, das zusätzlich zur ringständigen Peroxidgruppe eine Hydroperoxydgruppe enthält. Mittels Peroxidase wird PGG<sub>2</sub> in die entsprechende alkoholische Verbindung, das PGH<sub>2</sub> überführt. Beide Cycloendoperoxide sind hochreaktive Substanzen mit sehr kurzer Halbwertszeit. Aus PGH<sub>2</sub> können Prostaglandine, Prostacycline und Thromboxan A<sub>2</sub> gebildet werden. Das PGH<sub>2</sub> wird in PMN

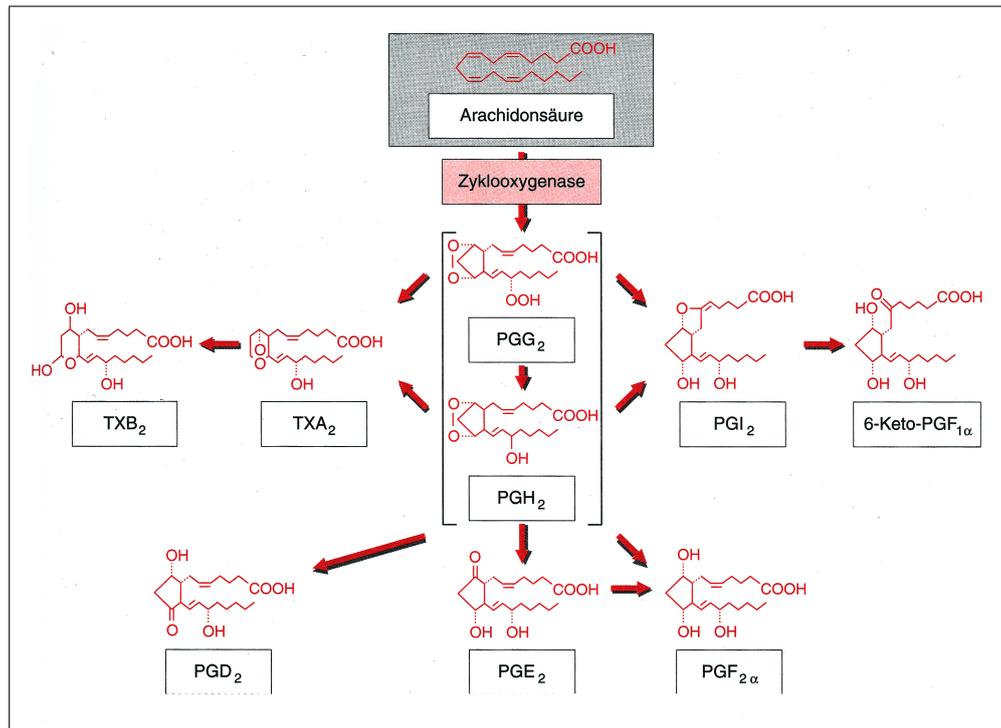


Abbildung 1.10: Der Cyclooxygenaseweg [49]

zu Prostaglandin E<sub>2</sub> und Thromboxan A<sub>2</sub> abgebaut. Das Thromboxan A<sub>2</sub> führt zu Vasokonstriktion und dient als Plättchenaktivator, wobei diese instabile Verbindung schnell in das inaktive Thromboxan B<sub>2</sub> abgebaut wird. Das Prostaglandin E<sub>2</sub> kann durch die Aktivierung der Adenylatcyclase die cAMP Konzentration erhöhen und dieser „Second messenger“ hat Einfluß auf Effekte wie die Chemotaxis [49].

### 1.6.3 AA als Aktivator der NADPH-Oxidase

Der AA werden im Stoffwechsel der PMN weitere Bedeutungen zugeschrieben: Zum einen aktiviert sie die NADPH-Oxidase und die H<sup>+</sup> Pumpe, wobei nachweislich nicht jeder Zellstimulus zur Produktion von O<sub>2</sub><sup>-</sup> führt [182]. Als weiteres aktiviert die AA als „Second messenger“ die PKC [23] und die MAPK [143]. Die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> kann durch AA erhöht werden, indem Kalzium aus intrazellulären Speichern freigesetzt, oder ein Kalzium Efflux verhindert wird [142, 167].

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Stoffwechselwege der Eikosanoidproduktion in PMN ergeben ein komplexes Bild von ineinander verzahnten Vorgängen. In den vorangehenden Kapiteln wurde versucht, die Grund-

strukturen der sich abspielenden Entzündungsreaktionen zu verdeutlichen. Das Ziel dieser Arbeit besteht in der Untersuchung einzelner intrazellulären Mechanismen der Eikosanoidproduktion. Eine besondere Rolle wurde den verschiedenen PLA<sub>2</sub> und der PLD zugemessen. Mit Hilfe von Inhibitoren wurden die begrenzenden Faktoren der LTB<sub>4</sub>-Produktion betrachtet, wobei die Stimulation der Zellen vorwiegend mit fMLP vorgenommen wurde. Als konkrete Problemstellung wurden folgende Aspekte bearbeitet:

- Der Nachweis der verschiedenen PLA<sub>2</sub> in PMN,
- die Untersuchung des Einflusses der verschiedenen PLA<sub>2</sub> und der PLD auf die AA-Freisetzung in fMLP-stimulierten PMN,
- die Rolle des Kalziums bei der Aktivierung der PLA<sub>2</sub>,
- die Untersuchung der 5-LOX-Aktivität in fMLP-stimulierten PMN mit der Fragestellung, welcher Faktor limitierend für die Herstellung der 5-LOX-Produkte ist.