

**Aus dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. med. U. Walter

**DIE REGULATION AKTIVIERENDER UND HEMMENDER
SIGNALWEGE IN HUMANEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN
DURCH cAMP- UND cGMP-ERHÖHENDE VASODILATATOREN**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Anna Fischer

aus Würzburg

Würzburg, November 2004

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Martin Eigenthaler

Koreferent: Prof. Dr. med. Ulrich Walter

Dekan: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 18.Mai 2005

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die Rolle von Neutrophilen Granulozyten für das menschliche Immunsystem	1
1.2. Neutrophile Granulozyten im menschlichen Körper	3
1.3. Neutrophile Granulozyten und ihre klinische Bedeutung	5
1.4. Signaltransduktion in Neutrophilen Granulozyten	7
1.5. Zielsetzung	14
2. Abkürzungen und Maßeinheiten	15
3. Materialien	19
3.1. Antikörper	19
3.2. Größenstandards	20
3.3. Vasoaktive /Chemotaktische Substanzen	20
3.4. Chemikalien	21
3.5. Verbrauchsmaterialien	22
3.6. Geräte	22
3.7. Software	23
3.8. Herstellung von Lösungen, Puffer und Gele	23
4. Methoden	26
4.1. Isolierung Neutrophiler Granulozyten aus dem humanen Blut	26
4.2. Stimulation der Neutrophilen Granulozyten mit Vasoaktiven Substanzen.....	27
4.3. Western Blot	28
4.4. Strippen von Western Blot	31
4.5. Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis der intrazellulären Proteine in Neutrophilen Granulozyten	31
5. Ergebnisse	35
5.1. VASP-Phosphorylierung in intakten humanen Neutrophilen Granulozyten nach Stimulation durch Vasodilatoren	35

5.1.1.	VASP-Phosphorylierung nach Stimulation mit cAMP- erhöhenden Substanzen.....	37
5.1.2.	VASP-Phosphorylierung nach Stimulation mit cGMP- erhöhenden Substanzen.....	46 56
5.2.	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der VASP-Phosphorylierung..	
5.3.	Aktivierung und Hemmung der p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1), der p38 MAPK sowie der Proteinkinase B (PKB) in humanen Neutrophilen Granulozyten.....	60
5.3.1.	Aktivierung der p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1), der p38 MAPK und der Proteinkinase B in humanen Neutrophilen Granulozyten.....	60
5.3.2.	Hemmung der p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1), der p38 MAPK und der Proteinkinase B durch Vasodilatoren in humanen Neutrophilen Granulozyten.....	65 81
6.	Diskussion	81
6.1.	VASP- Phosphorylierung in humanen Neutrophilen Granulozyten	
6.2.	Aktivierung und Hemmung der p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1), der p38 MAPK und der Proteinkinase B in Neutrophilen Granulozyten.....	88 94
7.	Zusammenfassung	96
8.	Literaturverzeichnis	

1. Einleitung

Neutrophile Granulozyten werden im Knochenmark produziert. Wie alle anderen blutbildenden Zellen des Knochenmarks entstammen auch die Neutrophilen Granulozyten einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle. Unter Einwirkung von IL-3 sowie auch der koloniestimulierenden Faktoren entwickeln sie sich über mehrere Stufen zu reifen Zellen und werden unter dem Einfluss von humoralen Signalen (wie z.B. IL-1 und Komplementfaktor C3) ins Blut freigesetzt. Normalerweise befinden sich 90% der Granulozyten im Knochenmark, nur ca. 3% im zirkulierenden Blut und der Rest im Gewebe. Etwa 95% aller Granulozyten (4500 Zellen / μl Blut) sind Neutrophile Granulozyten. Sie besitzen einen gelappten unterschiedlich geformten Kern sowie zytoplasmatische Granula.

1.1 Die Rolle von Neutrophilen Granulozyten für das menschliche Immunsystem

Alle Lebewesen kommunizieren mit Ihrer Umwelt. Da die Umwelt jedoch auch schädigend auf die Lebewesen einwirken kann, bedürfen sie einiger Schutzmechanismen, um diese schädigenden Einflüsse abzuwehren. Zu diesen Mechanismen gehören z.B. Phagozytose und Verdauung mikrobieller Krankheitserreger. Dabei ist Folgendes wichtig: das Abwehrsystem muss zwischen „selbst“ und „nicht selbst“ unterscheiden können. Diese Erkennung garantiert die Unversehrtheit eines Organismus.

Gegen Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten) und als „fremd“ identifizierte Makromoleküle besitzt der menschliche Körper eine unspezifische angeborene und eine spezifische erworbene Immunabwehr. Die angeborene Immunabwehr setzt keine vorherige Auseinandersetzung mit dem gleichen Erreger voraus. Eine zentrale Rolle bei dieser Art von Abwehr spielen Monozyten, Makrophagen und Neutrophile Granulozyten, die auch als Mikrophagen bezeichnet werden. All diese Zellen benutzen unspezifische Erkennungssysteme, die ihnen erlauben, gegen eine große Zahl von Erregern anzukämpfen.

1. EINLEITUNG

Die spezifische Immunabwehr setzt eine vorherige Auseinandersetzung des Organismus mit dem gleichen Erreger voraus. Eine zentrale Rolle bei dieser Abwehr spielen die Lymphozyten. Eine Gruppe von Lymphozyten, auch als B-Lymphozyten bezeichnet, besitzt eine antikörpervermittelte oder humorale Immunität. T-Lymphozyten sind für die zelluläre Immunität verantwortlich.

Das unspezifische und das spezifische Immunsystem sind keine voneinander unabhängigen Strukturen. Es existieren enge Wechselwirkungen zwischen Phagozyten der unspezifischen Abwehr (Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten) und den Zellen der spezifischen Immunabwehr. So können z. B. Phagozyten Antigene an die T-Lymphozyten präsentieren und damit eine spezifische Abwehr in Gang setzen. Aber auch Lymphozyten können ihrerseits die Funktion der Phagozyten positiv beeinflussen. So setzen z.B. T-Zellen Substanzen (Zytokine) frei, die Phagozyten aktivieren und B-Zellen produzieren Antikörper, die das Erkennen der pathogenen Substanzen durch die Phagozyten erleichtern (Riede und Schäfer, 2000).

Weltweit zählen Infektionserkrankungen zu den häufigsten Todesursachen. Besonders gefährliche Verläufe entstehen, wenn das Immunsystem nicht in der Lage ist, gegen die von außen eingedrungenen Erreger anzukämpfen. Dieser Zustand im menschlichen Körper wird als Immundefizienz bezeichnet. Dabei sind angeborene Defekte des Immunsystems seltener als erworbene. Als Beispiel für einen solchen Defekt ist ein Leukozytenadhäsionsdefekt bei Neutrophilen Granulozyten zu nennen, der eine gestörte Chemotaxis, Adhärenz und Phagozytosefunktion zur Folge hat. Bei Menschen, die an dieser Erkrankung leiden, treten häufig schwere rezidivierende und zum Teil systemische bakterielle Infektionen auf.

Jedoch birgt die Fähigkeit, Bakterien zu zerstören, auch eine Gefahr der autoimmunen Erkrankungen. Als Beispiel für eine Erkrankung, bei der die Neutrophilen Granulozyten eine Rolle spielen, kann die Rheumatische Arthritis genannt werden. Deshalb müssen Neutrophilenaktivierung und Hemmung eng reguliert werden. Die Entwicklung zukünftiger Strategien für die Therapie von Immundefizienz und Autoimmunerkrankungen erfordert daher ein umfassendes

Verständnis biochemischer Vorgänge in Neutrophilen Granulozyten auf molekularer Ebene.

1.2. Neutrophile Granulozyten im menschlichen Körper

Im Blut verteilen sich die Granulozyten je zur Hälfte auf einen marginalen Pool an den Gefäßwänden und auf einen zirkulierenden Pool. Wenn die Neutrophilen Granulozyten durch Chemotaxis angelockt werden, können sie ins Gewebe penetrieren. Dabei unterscheidet man folgende Teilvorgänge (Übersichtsartikel Burg und Phillinger, 2001):

1. Marginalisation: durch Entzündungsmediatoren (TNF- α , C5a) kommt es zur Expression von P-Selektin und E-Selektin durch Endothelzellen und zur Expression von L-Selektin durch die Granulozyten. Die Neutrophilen Granulozyten bleiben an den Endothelzellen locker „kleben“, werden dann aber mit dem Blutstrom wieder losgerissen. Dieser Vorgang von „kleben bleiben“ und wieder „losgerissen werden“ wird auch als „rollen“ bezeichnet (McEver et al., 1995; McEver und Cummings, 1997; Diacovo et al., 1996; Walcheck et al., 1996). Selektine scheinen aber nicht nur an der Marginalisation teilzunehmen, sondern auch zur Signaltransduktion und zur Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten beizutragen. So zeigen einige Studien, dass P-Selektin die Neutrophilendegranulation, Superoxidproduktion sowie auch die Depolarisation unter Einwirkung von bakteriellen Formylpeptiden wie N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) erleichtert (Lorant et al., 1993). Dies wird z.B. durch Phosphorylierung von MAPK gesteuert (Waddel et al., 1995).
2. Leukozytenadhäsion: durch verstärktes Expressieren von β_2 -Integrinen, vornehmlich des CD11/CD18-Komplexes auf den Neutrophilen Granulozyten und „interzellulärem Adhäsionsmolekül“ (ICAM-1 aus der Immunoglobulinsuperfamilie) auf der Oberfläche von Endothelzellen, bleiben die Neutrophilen Granulozyten immer mehr an dem Endothel haften. Die

Expression dieser beiden Moleküle wird durch chemotaktische Faktoren ausgelöst, dazu gehören IL-8, fMLP, C5a (Spaltprodukt der fünften Komponente des „klassischen“ Komplementsystemweges) und Leukotrien B₄ (LTB₄) (Williams, 1999).

3. Leukozytenmigration: das Haften der Neutrophilen Granulozyten an der Endothelzelloberfläche löst eine Kontraktion der Endothelzellen aus. Die Neutrophilen Granulozyten verformen sich, bilden pseudopodienartige Zellfortsätze und „quetschen“ sich durch die Lücken zwischen den Endothelzellen (Del Maschio, et al., 1996) oder direkt transendothelial hindurch (Feng et al., 1998). Durch Freisetzen von Metalloproteinasen lösen sie die Basalmembran auf und wandern ins Gewebe ein (Borregaard et al., 1997).
4. Chemotaxis: nach Binden der chemotaktischen Faktoren an den spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche verformen sich die Neutrophilen Granulozyten, und zwar so, dass die Pseudopodien sich in Richtung der höheren Konzentration der chemotaktischen Faktoren ausrichten. Gleichzeitig kommt es zu einem Ca²⁺-Einstrom in die Zelle und einem cAMP-Anstieg. Dadurch wird die Kontraktion des aktinhaltigen Filamentsystems ausgelöst.
5. Nach dem Erreichen der Entzündungsstelle sind Neutrophile Granulozyten phagozytotisch wirksam und setzen, neben Interferonen, proteolytische sowie auch chemotaktische Substanzen frei (Burg und Phillinger, 2001), um die pathogene Ursache der inflammatorischen Reaktion zu bekämpfen. Zu diesen Substanzen gehören Cathepsin G, Lactoferrin, Lysozym, reaktive Sauerstoffradikale (ROS) und einige andere.

1.3 Neutrophile Granulozyten und ihre klinische Bedeutung

a) Neutrophile Granulozyten und maligne Tumore

Die Theorie der immunologischen Überwachung wurde erstmals von Ehrlich 1900 formuliert und später als „immunsurveillance“ von MacFarlane Burnet bezeichnet. Sie beruht auf der Vorstellung, dass Zellen des Immunsystems die Tumorzellen erkennen und zerstören können, so, wie es auch bei mit Virus infizierten Zellen der Fall ist. Es bleibt aber bis heute ungewiss, ob eine solche Überwachung tatsächlich stattfindet, und ob sie bei den selten beobachteten Spontanremissionen von Bedeutung ist. Die Rolle von Neutrophilen Granulozyten in der Onkologie ist dementsprechend noch relativ unklar. Studien der letzten Jahre sind widersprüchlich und zeigen einerseits eine Abwehrfunktion der Neutrophilen Granulozyten gegen die Tumorzellen, andererseits aber auch einen Zusammenhang zwischen den Neutrophilen Granulozyten und der Tumorprogression.

So ist ein Zusammenhang zwischen der Leukozyteninfiltration von Tumoren und einer günstigen Prognose der Tumorerkrankungen, z.B. bei Mamma-Carzinomen, beschrieben worden (Hamlin, 1968; Black et al., 1975; Bassler et al., 1981). Hier scheinen Neutrophile Granulozyten die Tumoren entweder direkt durch Freisetzung von Defensinen, HOCl und Enzymen wie Elastase, Collagenase und Gelatinase oder indirekt durch die Produktion von Zytokinen und Chemokinen zu zerstören. Die von ihnen sezernierten Zytokine und Chemokine unterdrücken die Angiogenese und führen dadurch zur Ischämie und Nekrose von Tumoren (Übersichtsartikel Di Carlo et al., 2001).

Es existieren aber auch Studien die feststellen, dass Neutrophile Granulozyten eine transendotheliale Migration der Tumorzellen erleichtern (Übersichtsartikel Wu, 2000) und so zur Progression von Tumorerkrankungen beitragen. Dabei scheinen Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und Neutrophilen Granulozyten sowie auch zwischen Neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen von besonderer Bedeutung zu sein.

b) Neutrophile Granulozyten und kardiovaskuläre Erkrankungen

Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass Atherosklerose eine immunologisch vermittelte Erkrankung ist. So scheint der Prognosewert der Leukozytenzahl beim Herzinfarkt die gleiche Bedeutung wie der Serumcholesterinwert zu haben. Es ist von einem 4-fach erhöhten Risiko, einen Myokardinfarkt zu erleiden, für Personen mit erhöhten Leukozytenzahlen berichtet worden, vergleicht man diese mit der Bevölkerung, welche ein normales Blutbild aufweist (Friedman et al., 1974). Molekularbiologische Studien zeigen, dass freie Radikale, Zytokine, NO und Antioxidantien eine zentrale Rolle für die Pathogenese der Atherosklerose sowie auch für die Myokardschädigung im Rahmen eines Myokardinfarktes spielen (Übersichtsartikel Chakraborti et al., 2000). In einem frühen Stadium der Atherosklerose infiltrieren Neutrophile Granulozyten und Monozyten, die z. B. durch Hypertension oder Diabetes mellitus vorgeschädigte Intima der Gefäße und produzieren freie Radikale, die endothelschädigend wirken (Becker et al., 1993). Neutrophile Granulozyten scheinen auch bei den Umbauvorgängen nach einem Myokardinfarkt, dem so genannten „Remodeling“ eine große Rolle zu spielen. Unter „Remodeling“ versteht man strukturelle Umbau- und Anpassungsvorgänge des Herzens nach einem Herzinfarkt, die im ungünstigen Fall zu einer Expansion der Infarktnarbe, zu Hypertrophie und Dilatation des linken Ventrikels mit Verschlechterung der Prognose führen (Übersichtsartikel Ren et al 2003).

c) Neutrophile Granulozyten und Autoimmunerkrankungen

Seit vielen Jahren ist die Rolle von Neutrophilen Granulozyten bei der Pathogenese einiger Autoimmunerkrankungen bekannt. Ein klassisches Beispiel stellt die Rheumatische Arthritis dar. Hier sind Neutrophile Granulozyten in hoher Zahl in der Synovialflüssigkeit der Patienten nachgewiesen worden (Pillinger and Abramson, 1995). Die durch sie produzierten Zytokine sind an den entzündlichen Prozessen in den Gelenken beteiligt, sie selbst scheinen auch an der Knorpelzerstörung direkt teilzunehmen. Viele Studien der letzten Jahre untersuchen deshalb neue therapeutische Strategien in der Behandlung dieser Erkrankung (Biasi et al., 2003). Auch an der Pathogenese der autoimmunen neurologischen Erkrankungen sind

Neutrophile Granulozyten beteiligt. Als Beispiel können hier Multiple Sklerose und schwangerschaftsbedingte Eklampsie genannt werden (Vinatier und Monnier, 1995).

1.4 Signaltransduktion in Neutrophilen Granulozyten

a) Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten

Wie oben schon beschrieben gehören Neutrophile Granulozyten zu den wichtigsten Zellen der Immunabwehr. Durch viele biologisch aktive Moleküle, die im Körper als chemotaktische Faktoren fungieren, werden sie aktiviert. Zu den wichtigsten und stärksten gehören fMLP, ein aus Bakterien gewonnenes Peptid und gleichzeitig stärkster chemotaktischer Faktor, *platelet-activating factor* (PAF), C5a, ein Spaltprodukt der fünften Komplementkomponente des „klassischen“ Komplementsystemweges und eine Gruppe von kleinen (8-10 kDa) proinflammatorischen Zytokinen, die auch als Chemokine bezeichnet werden. Als Beispiel kann IL-8 genannt werden. Chemokine werden von unterschiedlichen Zelltypen produziert und ihre Sekretion wird meistens durch Infektionen, Verletzungen oder auch durch andere inflammatorische Zytokine ausgelöst.

Die chemotaktischen Faktoren wirken durch Interaktion mit spezifischen Zelloberflächenrezeptoren. Eine große Zahl an solchen Rezeptoren ist bereits schon kloniert und sequenziert worden (Baggiolini et al., 1997). All diese Rezeptoren sind für eine bestimmte Substanz spezifisch und haben eines gemeinsam: sie gehören zu den spezifischen heterodimeren 7-Helix-Rezeptoren. Solche Rezeptoren sind auf ihrer zytoplasmatischen Seite mit heterodimeren GTP-bindenden Proteinen (G-Proteinen) gekoppelt, welche als Vermittler funktionieren und Signale der aktivierten Rezeptoren an intrazelluläre Signalkaskaden weiterleiten. G-Proteine bestehen aus drei Komponenten: α , β und γ . Die α -Untereinheit ist in der Lage, ein Guaninnukleotid zu binden, entweder GTP oder GDP. Bindung des Liganden an den Rezeptorkomplex veranlasst das G-Protein, GDP gegen GTP auszutauschen. Dadurch wird das G-Protein aktiviert, dissoziiert vom Rezeptor ab und zerfällt in α - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Die GTP tragende α -Untereinheit heftet sich an die Effektorproteine und ändert ihren Aktivitätszustand, es kommt zur Aktivierung der

1. EINLEITUNG

Phospholipase C (PLC), der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), der Adenylatzyklase sowie anderer für die Transduktion in Neutrophilen Granulozyten wichtigen Proteine. Durch langsame enzymatische Hydrolyse des GTP zu GDP kehrt die α -Untereinheit in den inaktiven Zustand zurück und verbindet sich wieder mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit.

Hier sind einige Effektorproteine aufgeführt, die durch Bindung des biologisch aktiven Moleküls am chemotaktischen Rezeptor aktiviert werden.

PLC katalysiert die Hydrolyse des Membranlipids Phosphatidyl-Inositol-Bisphosphat $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ und erzeugt dadurch die Bildung von zwei „second messengers“: Inositol-1,4,5-triphosphat $\text{PI}(1,4,5)\text{P}_3$ und Diacylglycerol (DAG). IP_3 setzt Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern frei. DAG verbleibt dagegen in der Zellmembran und aktiviert Proteinkinase C (PKC), die in Gegenwart des freigesetzten Ca^{2+} Proteine phosphoryliert und dadurch ihren Funktionszustand ändert (Bokoch, 1995). Der PKC wird eine Schlüsselstellung in intrazellulären Signalkaskaden der Neutrophilen Granulozyten zuerkannt. $\text{p}47^{\text{phox}}$ und $\text{p}67^{\text{phox}}$ gehören zu den Substraten der PKC. Sie sind Untereinheiten der NADPH-Oxidase. Die Phosphorylierung von $\text{p}47^{\text{phox}}$ und $\text{p}67^{\text{phox}}$ ist für die Produktion der Superoxidradikale und „*respiratory burst*“ notwendig (Fontayne, 2002; Han et al., 1998).

Zum weiteren Angriffspunkt der G-Proteine gehören ras-verwandte Proteine der Unterfamilie Rho, z.B. RhoA, und Rac (Quinn, 1995). Diese sind kleine GTP-asen, die als Schalter der zytoskelettalen Organisation zu verstehen sind. Bei den GTP-asen unterscheidet man einen aktiven Zustand (mit gebundenem GTP) sowie einen inaktiven Zustand (mit gebundenem GDP). RhoA kann beispielsweise über nachgeschaltete Kinasen die Phosphorylierung der Myosin-II-Leichtkette in Epithelzellen induzieren und damit direkt für epitheliale Bewegung notwendige Aktin-Myosin-Kontraktion auslösen (Hafner et al., 2002). Die Aktivierung von Rac führt in einigen Zellsystemen zu einer Neustrukturierung des Zytoskeletts und damit zur Filopodienbildung und zur Adhäsion (Nobes et al., 1995). So verhindert die Inhibierung des RhoA eine Adhäsion der Neutrophilen Granulozyten am Fibrinogen, welche durch chemotaktische Faktoren ausgelöst wird (Laudanna et al., 1996).

Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) kann entweder direkt durch $\beta\gamma$ -Untereinheiten des G-Proteins oder indirekt durch Rho und Ras-GTPasen aktiviert werden (Burg und Phillinger, 2001). Zu ihren Substraten gehören Lipide und Proteine und sie nimmt eine sehr wichtige Stellung in zellulären biochemischen Vorgängen ein. Auch ist sie unabdingbar für durch chemotaktische Faktoren ausgelösten „*respiratory burst*“, Adhäsion und Chemotaxis (Ahmed, et al., 1995; Knall et al., 1997). All diese Vorgänge in Neutrophilen Granulozyten konnten durch Wortmannin, einen PI3K-Inhibitor unterdrückt werden (Burg und Phillinger, 2001). Proteinkinase B (PKB) ist eines der am besten untersuchten Substrate der PI3K. Sie ist in vielen Zellen Schlüsselenzym der Zellproliferation und Apoptose. Da diese Arbeit sich mit Aktivierungs- und Hemmungsvorgängen der PKB beschäftigt, sind genauere Informationen zu PI3K und PKB im Kapitel „Ergebnisse“ zusammengefasst.

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) gehören ebenfalls zu den wichtigsten Signalübermittlern der aktivierenden Substanzen. Es sind Serin/Threoninkinasen, die eine zentrale Rolle bei der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Reaktion auf Stressfaktoren wie osmotischer Schock, Hitzeschock und UV-Licht spielen (Seeger und Krebs, 1995). Zu der Gruppe der MAPK gehören p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1) [Erk=*extracellular signal regulated protein kinase*], p38 MAPK, Jnk und viele andere. Die vorliegende Arbeit untersucht die Vorgänge, die für Aktivierung und Hemmung der p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1) und p38 MAPK verantwortlich sind. Genauere Hintergrundinformationen sind deshalb im Kapitel „Ergebnisse“ aufgeführt.

Im Unterschied zu den Vorgängen, die durch chemotaktische Faktoren in Neutrophilen Granulozyten ausgelöst werden (z.B. Adhäsion, Chemotaxis und „*respiratory burst*“), kann die Phagozytose nur durch direkten Kontakt mit Bakterien in Gang gesetzt werden. Als Ausnahme dienen durch Immunglobuline gebundene oder durch Komplementfaktoren „opsonisierte“ Antigene. Neutrophile Granulozyten exprimieren auf ihrer Membranoberfläche Rezeptoren für Immunglobuline Fc γ RII und Fc γ RIII mit niedriger Affinität. Nach Inkubation mit INF- γ können jedoch auch hoch-affine Fc γ RI Immunglobuline auf ihrer Oberfläche exprimiert werden (Perussia et al., 1983). Durch Bindung des IgG-opsonierten Partikels an dem Fc-Rezeptor wird der für die Phagozytose verantwortliche Rezeptor ITAM (*immunoreceptor tyrosin based*

activation motif) phosphoryliert und die Phagozytose dadurch eingeleitet (Mitchell et al., 1994).

b) Hemmung von Neutrophilen Granulozyten

Im Gegensatz zu Aktivatoren wie fMLP, IL-8 und PAF werden Neutrophile Granulozyten durch cAMP-erhöhende Substanzen gehemmt. Zu den Substanzen, die die intrazelluläre Konzentration von cAMP in Neutrophilen Granulozyten erhöhen, gehören Epinephrine, Histamine, Cholera Toxin, Serotonin und Prostaglandine der E- und I-Reihen (Tse et al., 1972; Hill et al., 1975; Anderson et al., 1977). Für all diese Substanzen ist ein hemmender Einfluss auf die Beweglichkeit der Neutrophilen Granulozyten bereits bewiesen. Für cAMP-senkende Substanzen wie Imidazole und ADP wurde eine Zunahme der Beweglichkeit dieser Zellen beschrieben (Tse et al., 1972).

Für cAMP wurde eine Hemmung der PLC (Mueller et al., 1992) nachgewiesen. Auch eine Hemmung der PI3K ist seit längerem schon vermutet worden (Ahmed et al., 1995) und wurde erst vor kurzem bewiesen (Burelout et al., 2004). Dementsprechend beobachtete man in vielen Experimenten eine Hemmung der Chemotaxis, Produktion von Sauerstoffradikalen und der Exozytose von Neutrophilengranula (Quilliam et al., 1991), all diese Prozesse werden unter anderem durch PLC und PI3K vermittelt (siehe auch oben).

Die Konzentration der cAMP wird nicht nur durch Aktivierung der Adenylatzyklen beeinflusst, sondern in entscheidendem Maße auch durch den Abbau der Nucleotide unter dem Einfluss der Phosphodiesterasen (PDE), welche cAMP in das inaktive AMP überführen. In Neutrophilen Granulozyten ist fast ausschließlich PDE₄ vorhanden. Auch unter dem Einfluss der PDE₄-Inhibitoren Rolipram, RP-73401 und Ariflo ist eine verminderte Ansprechbarkeit der Neutrophilen Granulozyten auf inflammatorische Stimuli beobachtet worden (Bruno et al., 2004; Mueller et al., 1992; Wright et al., 1990; Bevilacqua et al., 1994).

Erstaunlicherweise gehören chemotaktische Aktivatoren der Neutrophilen Granulozyten wie fMLP auch zu den Substanzen, die intrazelluläres cAMP erhöhen (Smolen et al., 1980). Ob hier eine direkte Stimulation der Adenylatzyklase durch fMLP vorliegt ist noch unklar. Es bleibt auch unklar, ob es sich dabei um einen „feedback-Mechanismus“ handelt, der Neutrophile Granulozyten vor der Überstimulation bewahrt.

Nicht so eindeutig ist der Einfluss des zyklischen Nukleotids cGMP auf die Funktion der Neutrophilen Granulozyten. Vor einigen Jahren hat man die so genannte „Yin-Yan“-Hypothese vertreten: cAMP habe einen inhibitorischen, cGMP dagegen einen stimulierenden Einfluss auf die Neutrophilen Granulozyten. Durch Studien der letzten Jahre wurde diese Hypothese revidiert, da sehr widersprüchliche Ergebnisse beschrieben worden sind, die einerseits von einem stimulierenden, andererseits von einem hemmenden Einfluss berichteten (Übersichtsartikel Elferink et al., 1992).

Wie oben schon erwähnt, gehören viele Vasodilatoren, wie z.B. Prostaglandin E₁, welches vom Endothel sezerniert wird und bei Gefäßverschlüssen therapeutisch eingesetztes Prostaglandin I₂ (Epoprostenol=Flolan®) zu den cAMP-erhöhenden Substanzen, weil sie durch Stimulation der Adenylatzyklase zu einem intrazellulären cAMP-Anstieg führen. Zu den cGMP-erhöhenden Substanzen gehören Nitrovasodilatoren wie z.B. das häufig in der Klinik eingesetzte Glyzeroltrinitrat (Nitrolingual®). Auch vom Endothel gebildeter „*endothelium derived relaxing factor*“ (EDRF), der nach bisherigen Erkenntnissen mit Stickstoffmonoxid identisch ist (Furchgott und Vanhoutte, 1989) sowie viele Peptidhormone wie „*atrial natriuretic peptid*“ (ANP), „*brain natriuretic peptid*“ (BNP) und in dieser Arbeit verwendeter synthetisch hergestellter NO-Donor SNP (Natriumnitroprussid) gehören zu den cGMP-erhöhenden Substanzen (Saxon und Kattlove, 1976). Intrazelluläre cAMP und cGMP aktivieren wiederum die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) bzw. die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) (Sandberg et al., 1991; Butt et al., 1992; Geiger et al., 1992; Eigenthaler et al., 1992). Aktivierte PKA vermittelt dann biologische Effekte in den Zellen durch Phosphorylierung spezifischer Substratproteine. Der Nachweis der PKA in Neutrophilen Granulozyten erfolgte bereits vor langem. Der eindeutige Nachweis von PKG blieb bis jetzt jedoch noch aus. So konnte PKG in niedriger Konzentration zwar mittels der Immunfluoreszenz-

Technik unter Verwendung eines polyklonalen Antiserums nachgewiesen werden (Pryzwanski et al., 1990), es war bis jetzt jedoch nicht möglich, PKG mittels der Western Blot-Technik nachzuweisen (Klippel, 1997).

Viele Substrate der PKA und PKG sind bereits identifiziert worden. Dazu gehört das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP). VASP ist ein bereits gut charakterisiertes Protein, welches in vielen menschlichen Zellen exprimiert wird. Dieses Protein ist bereits in Thrombozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen der Gefäße und Fibroblasten identifiziert worden (Waldman et al., 1987; Halbrügge et al., 1990; Reinhard et al., 1992; Draijer et al., 1995). In verschiedenen Zelltypen ist VASP mit Mikrofilamenten assoziiert und lässt sich insbesondere in Zell-Zell-Kontakten und Kontaktstellen der Zellen mit der Umgebung (sogenannten „*focal contacts*“) nachweisen (Reinhard et al., 1992). VASP-Phosphorylierung und seine Phosphorylierungskinetik unter dem Einfluss der cAMP- und cGMP-erhöhenden Vasodilatoren werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. Im Kapitel „Ergebnisse“ sind weitere Hintergrundinformationen zu VASP aufgeführt.

Zu PKA-Substraten gehört auch das schon oben erwähnte p47^{phox}, eine regulatorische Einheit der NADPH-Oxidase. Ihre Phosphorylierung durch PKA führt im Gegensatz zur PKC-induzierten Phosphorylierung jedoch nicht zum „*respiratory burst*“ (Quilliam et al., 1991). Außerdem ist für PKA eine Hemmung der PLC (Mueller et al., 1992) und der PI3K nachgewiesen worden (Burelout et al., 2004). Dementsprechend beobachtete man in vielen Experimenten eine Hemmung der Chemotaxis, Produktion von Sauerstoffradikalen und der Exozytose von Neutrophilengranula durch PKA (Quilliam et al., 1991).

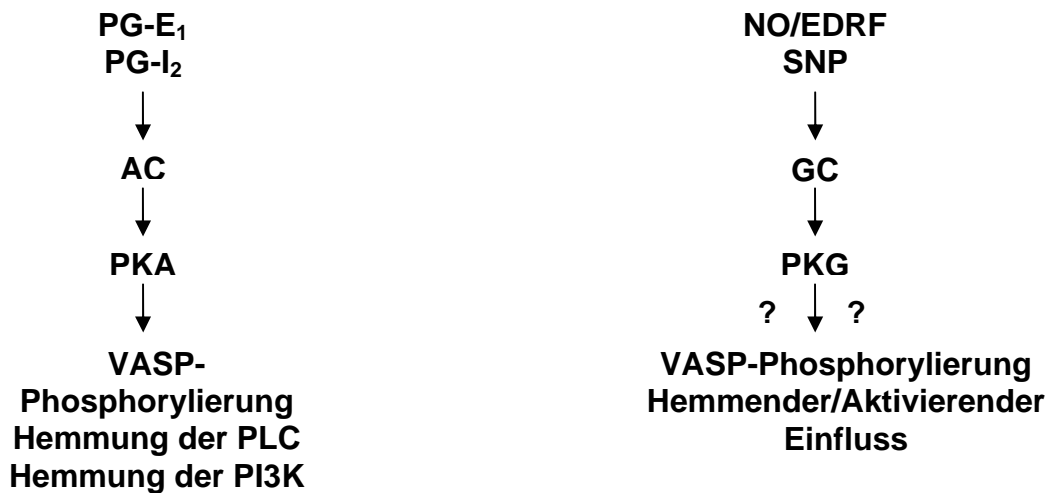
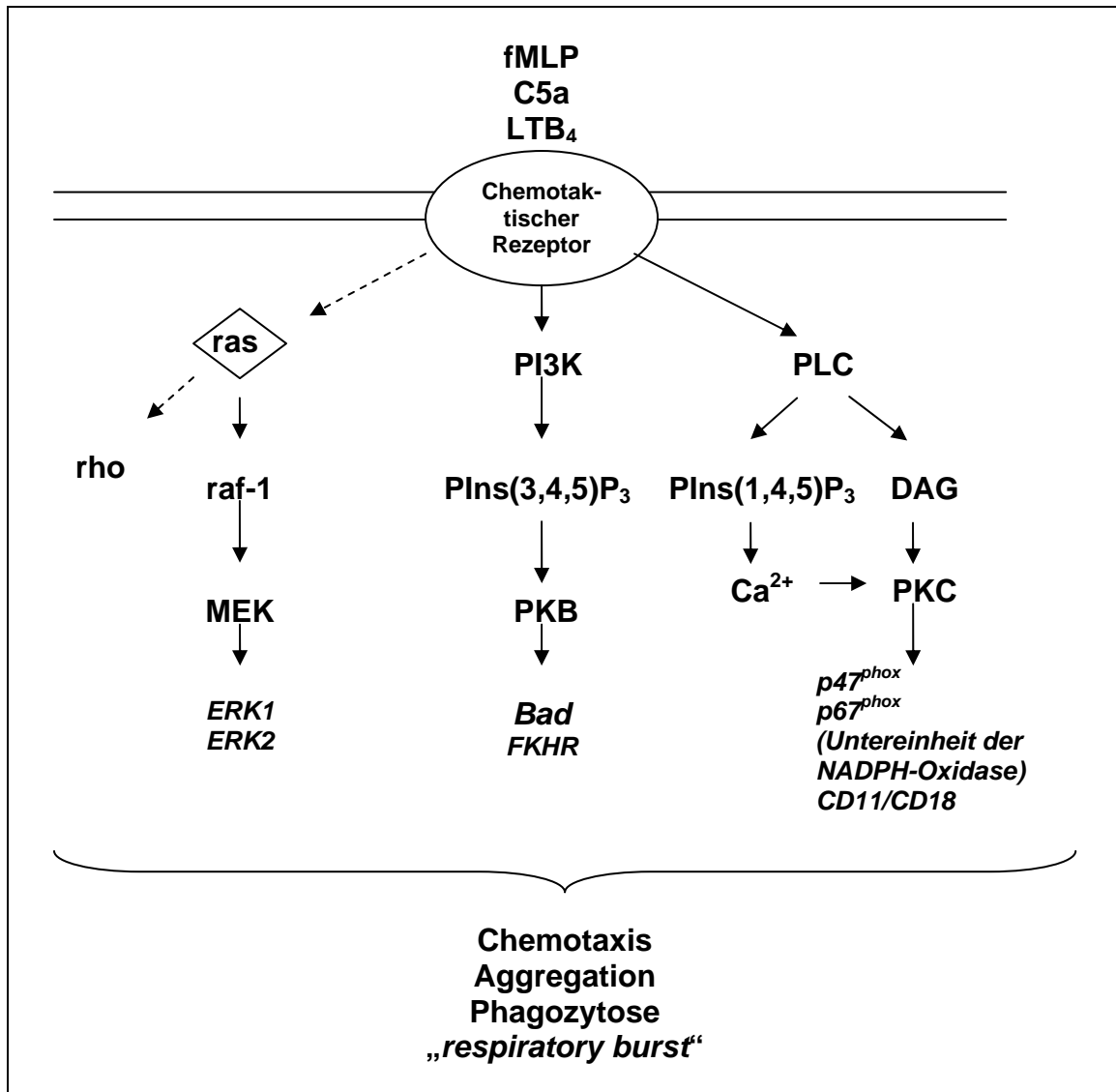


Abbildung 1.4.1

Biochemische Transduktionswege in Neutrophilen Granulozyten

1.5 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die aktivierenden und hemmenden Transduktionswege in Neutrophilen Granulozyten zu klären. Mit Methoden der Western Blot-Technik und der Immunfluoreszenz sind Einflüsse von verschiedenen Vasodilatoren auf die VASP - Phosphorylierung, einen biochemischen Vorgang der die Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten hemmt, untersucht worden. Auch Versuche zu aktivierenden Transduktionswegen, wie die Phosphorylierung der MAPK und PKB unter dem Einfluss von fMLP, erfolgten mittels der Western Blot-Technik. Diese Arbeit hat es sich auch zum Ziel gesetzt, nach Wechselwirkungen zwischen aktivierenden und hemmenden Wegen zu forschen. So wurden hemmende Einflüsse der Vasodilatoren auf die fMLP-induzierte Phosphorylierung der MAPK und der PKB untersucht.

Wie oben schon beschrieben, muss der Aktivierungszustand der Neutrophilen Granulozyten sehr straff reguliert werden. Eine ungenügende Stimulation der Neutrophilen Granulozyten kann im menschlichen Körper zu einer Immundefizienz und damit verbundenen Infektionserkrankungen und malignen Tumoren führen. Eine Überstimulation von Neutrophilen Granulozyten ist dagegen an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen z.B. Rheumatoider Arthritis beteiligt. Um neue Wege in der Prävention und in der Therapie dieser Krankheiten zu erforschen, ist eine genaue Kenntnis der biochemischen Aktivierungs- und Hemmungsvorgängen in den Neutrophilen Granulozyten notwendig.

2. Abkürzungen und Maßeinheiten

Abkürzungen

AC	<i>adenylyl cyclase</i>
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ANP	<i>atrial natriuretic peptid</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BNP	<i>brain natriuretic peptid</i>
BSA	bovines Serumalbumin
C3	Komplementfaktor C3
C5a	Spaltprodukt der fünften Komplementkomponente
Ca	Calcium
ca.	circa
cAMP	<i>cyclic adenosine-3',5'-monophosphate</i>
cAMP-PK=PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
CD11/CD18	<i>cluster designation complex 11/ cluster designation complex 18</i>
cGMP	<i>cyclic guanosine-3',5'-monophosphate</i>
cGMP-PK=PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
DAG	1,2-Diacylglycerol
EDGF	<i>endothelium-derived growth factor</i>
EDRF	<i>endothelium-derived relaxing factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
FKHR	<i>forhead in rhabdomyosarkoma</i> , ein Transkriptionsfaktor
fMLP	N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
G α	α -Untereinheit eines heterodimeren G-Proteins

2. ABKÜRZUNGEN UND MASSEINHEITEN

G $\beta\gamma$	$\beta\gamma$ - Untereinheit eines heterodimeren G-Proteins
GC	<i>guanylyl cyclase</i>
G-CSF	Granulozyten Coloniestimulierender Faktor
GDP	Guanosindiphosphat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Coloniestimulierender Faktor
G-Proteine	heterotrimeres Guaninnukleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HBS	<i>Hanks' Balanced Solution</i> Inkubationspuffer für Neutrophile Granulozyten
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i> Inkubationspuffer für Neutrophile Granulozyten
Hepes	N-(2-Hydroethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Hsp27	<i>heat shock protein 27</i>
ICAM-1	<i>intracellular adhesion molecule-1</i>
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
IL-8	Interleukin-8
INF	Interferon
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosin based activation motiv</i>
Jnk	<i>c-Jun N-terminal protein kinase</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LRP	Leukozytenreiches Plasma
LTB ₄	Leukotrien B ₄
MAP	<i>microtubuli-associated protein</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKAP	<i>MAPK-activated protein kinase</i>
NO	<i>nitric oxide</i>
PACAP	<i>puritary adenulate cyclase-activating protein</i>
PAF	<i>platelet-activating factor</i>

2. ABKÜRZUNGEN UND MASSEINHEITEN

PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> ; NaCl/Phosphatpuffer
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDK	<i>phosphoinositide-dependent kinase</i>
PG-E ₁	Prostaglandin E ₁
PG-E ₂	Prostaglandin E ₂
PG-I ₂	Prostaglandin I ₂ (Flolan [®] =Epoprostenon)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Konzentration in wässriger Lösung
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PI(3)P	Phosphatidylinositol-3-phosphat
PI(3,4)P ₂	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat
PI(3,4,5)P ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PI(1,4,5)P ₃	Phosphatidylinositol-1,4,5-trisphosphat
PKB/Akt	Proteinkinase B/c-Akt
PKC	Proteinkinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PRP	Plättchenreiches Plasma
PTEN	<i>phosphatase and tension homologue detected on chromosome ten</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SAPK	<i>stress-activated protein kinase</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
Ser	Serin
SNP	<i>sodium nitroprusside</i>

2. ABKÜRZUNGEN UND MASSEINHEITEN

Tau	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
TEMED	Tetramethyldiamin
Thr	Threonin
TNF α	<i>tumor necrosis factor α</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylen-(20)-monolaurat
UV-Licht	Ultraviolett-Licht
VASP	<i>vasodilatator-stimulated phosphoprotein</i>
z. B.	zum Beispiel
8-pCPT-cGMP	<i>8-(4-Chlorophenylthio)guanosine-3'5'-cyclic monophosphate</i>

Dezimale Teile und Vielfache

n	nano (10^{-9})
μ	mikro (10^{-6})
m	milli (10^{-3})
k	kilo (10^3)

Maßeinheiten

A	Amper
°C	Grad Celsius
Da	Dalton
h	Stunde
l	Liter
m	Meter
M	Molar (Mol/l)
min	Minute
V	Volt
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m/s}^2$)

3. Materialien

3.1 Antikörper

Tabelle 3.1.1 Primäre Antikörper

Bezeichnung	Antigen	Markierung	Spezies	Bezugsquelle	Endkonzentration/ Verdünnung
M4	VASP	—	Kaninchen, polyklonal	Immuno Globe	1:3000
16C2	Phospho- Ser-239-VASP	—	Maus IgG, monoklonal	nanoTools	2 µg/ml
5C6	Phospho- Ser-157-VASP	—	Maus IgG, monoklonal	nanoTools	1 µg/ml
anti-Phospho- p42/p44 (12D4)	Phospho-Thr 202/ Tyr204- p42/44	—	Maus IgG, monoklonal	nanoTools	0,4 µg/ml
anti-ERK1	p44 MAPK	—	Maus IgG, monoklonal	Pharmingen	0,5 µg/ml
anti-ERK2	p42 MAPK	—	Maus IgG, monoklonal	nanoTools	0,1 µg/ml
anti-Phospho- p38 MAPK	Phospho-Thr 180/ Tyr182- p38	—	Kaninchen, polyklonal	BioLabs	1:1000
anti- p38 MAPK	p38 MAPK	—	Kaninchen, polyklonal	BioLabs	1:1000
anti-Phospho- Akt (PKB)	Phospho-Akt (Ser-473)	—	Kaninchen, polyklonal	BioLabs	1:1000
anti-Akt (PKB)	PKB	—	Kaninchen, polyklonal	BioLabs	1:1000

Tabelle 3.1.2 Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Antigen	Markierung	Spezies	Bezugsquelle	Endkonzentration/ Verdünnung
Ziege-anti-Maus-HRP	Maus-IgG	HRP	Ziege	BioRad	1:3000
Ziege-anti-Kaninchen-HRP	Kaninchen-IgG	HRP	Ziege	BioRad	1:3000
Ziege-anti-Maus-Cy3	Maus-IgG	Cy3	Ziege	Dianova	1:4000

3.2 Größenstandards

➤ Größenstandardproteine: Kaleidoscope Prestained Standards (Bio Rad)

3.3 Vasoaktive /Chemotaktische Substanzen

➤ PG-E₁ (Sigma)

Stocklösung wird bei -20°C aufbewahrt. Kurz vor dem Versuchsbeginn wird ein Aliquot auf die gewünschte Konzentration mit Hilfe von 10 mM Glucose eingestellt.

➤ Flolan (Epoprostenon Sodium = PG-I₂; Wellcome)

Industriell hergestellte Fläschchen mit 500 µg trockenem Flolan-Pulver werden kurz vor dem Versuchsbeginn mit 50 ml beiliegender Lösung (enthält 0,147% Natrium Chlorid und 0,188% Glycine) aufgelöst.

➤ SNP (Natriumnitroprussid; Sigma)

10 mM Stocklösung wird kurz vor dem Versuchsbeginn mit destilliertem Wasser hergestellt und mit dem Inkubationspuffer auf die benötigte Konzentration verdünnt. SNP ist sehr lichtempfindlich und darf nur im Dunkeln aufbewahrt werden.

3. MATERIALIEN

➤ cGMP-Analog 8-pCPT-cGMP (BioLog)

8-pCPT-cGMP ist ein synthetisch hergestelltes Analog des intrazellulären Signalmoleküls cGMP. Im Gegensatz zum natürlichen cGMP ist das Analog wesentlich lipophiler und kann deshalb durch die Zellmembran diffundieren.

20 mM Stocklösung wird bei -20°C aufbewahrt. Vor Versuchsbeginn wird die gewünschte Konzentration des Aliquots mit Hilfe der 10 mM Glucose eingestellt.

➤ fMLP

Stocklösung wird bei -20°C aufbewahrt. Kurz vor dem Versuchsbeginn wird ein Aliquot auf die gewünschte Konzentration mit destilliertem Wasser eingestellt. fMLP ist sehr licht- und wärmeempfindlich und darf nur im Dunkeln aufbewahrt werden.

3.4 Chemikalien

- Aceton (J.T. Baker)
- 30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid (J.T. Baker)
- APS (Sigma)
- Aqua dest: Ampuwa (Fresenius), Aqua ad iniectabilia (Delta Select)
- BSA (Sigma)
- Bromphenolblau (Sigma)
- CaCl₂ (Sigma)
- Citrat/Glucosemonohydratlösung =ACD-Formula A (Biotrans GmbH)
- D-Glucose (Sigma)
- Ethanol (J.T. Baker)
- ECL-Lösung (Amersham Biociences)
- Ficol-Paque[®] (Amersham Biociences)
- Formaldehyd, 10%, methanolfrei (Sigma)
- Glycerin (Sigma)
- Glycin (Sigma)
- Hepes (Sigma)
- HBS-Lösung (Gibco)
- Makrodex 6% =Dextran/NaCl-Lösung (Pharmalink)
- 2-Mercaptoethanol (Sigma)
- Methanol (J.T. Baker)

3. MATERIALIEN

- MgCl₂ (Sigma)
- MgSO₄ (Sigma)
- Milchpulver (BioRad)
- Moviol (Dabko)
- NH₄Cl (Sigma)
- Paraformaldehyd (Sigma)
- PBS-Lösung, Ca²⁺- und Mg²⁺-frei (Gibco)
- Ponceau-Rot (Sigma)
- SDS (Sigma)
- Sucrose (Sigma)
- TEMED (Sigma)
- Trisma-Base (Sigma)
- Tween-20 (Sigma)

3.5 Verbrauchsmaterialien

- 21G-Blutentnahmekanülen
- Fotofilme: Kodak
- Nitrocellulose Transfermembran:
 - Protran, Porengröße 0,2 µm (Schleicher & Schuell)
- Pipettenspitzen, Glaspipetten
- PVDF-Transfermembran: Immobilon-P, Porengröße 0,45 µm (Millipore)
- Reagenzgläser (Greiner/Eppendorf)
- Röntgenfilme:
 - Medical Film (Konica)
 - Hyperfilm ECL (Amersham Biociences)
- Whatmann-Papier (Schleicher & Schuell)

3.6 Geräte

- Elektrophoresenkammer für Polyacrylamid-Minigele, Mini Protean II (BioRad)
- Elektrophoresenkammer für Polyacrylamid-Gele (Noras)
- Deckgläschen für Immunfluoreszenz (Superclear)
- Lab-Tek[®]-Kammer für Immunfluoreszenz (Nalge Nunc International)

3. MATERIALIEN

- Mikroskop, Axiovert 25 (Zeiss)
- Pipettierhilfen (Gilson)
- Röntgenfilmentwickler, Optimax (Protec)
- Spannungsgerät, Power Pac 200 (BioRad)
- Scanner, Expression 1680 Pro (EPSON)
- Stoppuhr
- Schüttler, Duomax 1000 (Heidolph)
- Transferkammer für Western Blots, Trans-Blot Cell (BioRad)
- Wasserbad, Julabo TWB5
- Zellzählgerät, Technicon H-3 RTC (Bayer)
- Zentrifugen: Roto Silenta/K (Hettich)
Eppendorf Centrifuge 5415 C (Eppendorf)
- Zellkocher, Eppendorf Termomixer comfort (Eppendorf)

3.7 Software

- NIH Image (Version 1.61)
- PhotoLook (1996, Agfa-Gevaert N.V.)
- Microsoft Office XP (2000)

3.8 Herstellung von Lösungen, Puffer und Gele

➤ SDS-Stopplösung :

Tris/HCl pH 6,7	200 mM
Glycerin	15 %
SDS	6 %
Bromphenolblau	0,03 %
2-Mercaptoethanol → wird erst kurz vor der Verwendung zugesetzt	10 %

...für Western Blot

➤ **Sammelgel (3%):**

Aqua dest.	5,44 ml
30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid	750 µl
0,5 M Tris/HCl pH 6,7	940 µl
10% SDS-Lösung	75 µl
TEMED	3,75 µl
10% APS (0,1 g/ml)	150 µl

Während der Polymerisation wurde das Trenngel mit 70% Ethanol überschichtet.

➤ **Trenngel (9%):**

Aqua dest.	8,4 ml
30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid	4,5 ml
3 M Tris/HCl pH 6,7	1,88 ml
10% SDS-Lösung	150 µl
TEMED	7,5 µl
10% APS (0,1 g/ml)	150 µl

➤ **Elektrophoresepuffer**

Trizma-Base	50 mM
Glycin	191 mM
SDS	0,1 %

Herstellung des Puffers erfolgte mit Aqua dest.

➤ **Transferpuffer**

Trizma-Base	25 mM
Glycin	193 mM
Methanol	20 %

Herstellung des Puffers erfolgte mit Aqua dest.

3. MATERIALIEN

➤ **Waschpuffer** (TBS/Tween)

Trizma-Base	55 mM
NaCl	167 mM

Einstellen des Puffers auf pH 7,6 mit HCl, Herstellung des Puffers mit Aqua dest., dann erfolgte Zugabe von:

Tween-20	0,1%
----------	------

➤ **Blockmedium**

Milch 6% in TBS/Tween

➤ **Western Stripp Puffer**

1 M Trispuffer, pH 6,8	62,5 mM
10 % SDS	1%

Herstellung des Puffers mit Aqua dest., dann erfolgte Zugabe von:

2-Mercaptoethanol	1%
-------------------	----

...für Immunfluoreszenz

➤ **GBSS-Puffer pH 7,2**

Hepes	10 mM
CaCl ₂	1,5 mM
MgCl ₂	1 mM
MgSO ₄	0,3 mM

➤ **PBS/HS-Lösung**

50% PBS-Lösung (Ca²⁺- und Mg²⁺-frei)

50% humanes Serum

4. Methoden

4.1 Isolierung Neutrophiler Granulozyten aus dem humanen Blut

Neutrophile Granulozyten wurden aus dem Blut gesunder Spender nach der Punktion der Vena cubitalis mit einer 21 G-Kanüle isoliert. Langes Stauen wurde vermieden, so konnte die Aktivierung der Blutzellen verhindert werden. Um die Koagulation des Blutes zu vermeiden, wurde das abgenommene Blut mit einer Citrat/Glucosemonohydratlösung (ACD-Formula A) im Verhältnis 4:1 gemischt. Rasches Pipettieren wurde ebenfalls vermieden, um eine Zellaktivierung durch große Scherkräfte zu verhindern. Alle Versuchsschritte wurden bei Raumtemperatur oder im Wasserbad bei 37°C durchgeführt.

Direkt nach der Blutentnahme erfolgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 300 g, dabei kam es zur Trennung des Blutes in thrombozytenreiches Plasma (PRP) als oberste Schicht, Erythrozyten als unterste Schicht und Leukozyten als Grenzschicht zwischen Erythrozyten und PRP („*buffy coat*“). PRP wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Die verbleibenden zwei Schichten wurden mit einer Dextran/NaCl-Lösung (6%Macrodex) auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt und die dadurch entstandene Blut-Macrodex-Lösung auf 15 ml-große Reagenzgläser verteilt.

Nach anschließendem 90-minütigen Sedimentieren der Erythrozyten bei Raumtemperatur kam es zur Bildung eines Überstandes aus leukozytenreichem Plasma (LRP). Das LRP wurde mit Hilfe einer Pipette abgenommen und mit gleicher Menge Ficoll-Paque[®] unterschichtet. Ficoll-Paque[®] erlaubt eine schnelle Isolierung von Lymphozyten nach einer kurzen Zentrifugation. Deshalb kam es nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 350 g zur Bildung von vier Schichten. Die oberste Schicht stellten Thrombozyten mit Plasmabestandteilen dar, gefolgt von einer Schicht aus Lymphozyten und einer Schicht Ficollösung. Die unterste Schicht bildete ein Pellet aus Erythrozyten und Neutrophilen Granulozyten. Die oberen drei Schichten wurden vorsichtig mit Hilfe einer Glaspipette entfernt und die Erythrozyten aus dem übrig gebliebenen Pellet durch Zugabe von 1 ml destilliertem Wasser auf

Eis lysiert. Die Lyse wurde mit Hilfe von 5 ml HBS-Lösung (mit 10 nM Glycose+0,1% BSA) gestoppt.

Anschließend wurde die Zelllösung für 5 Minuten bei 120 g abzentrifugiert und das Pellet mit HBS-Lösung (mit 10 nM Glucose) bis zur gewünschten Zellkonzentration resuspendiert.

4.2 Stimulation der Neutrophilen Granulozyten mit Vasoaktiven Substanzen

Neutrophile Granulozyten wurden wie im Abschnitt 4.1 beschrieben isoliert und mit Hilfe der HBS-Lösung (mit 10 mM Glucose) auf eine Konzentration von 10^7 Zellen pro μl eingestellt. Die physiologische Konzentration von Neutrophilen Granulozyten im menschlichen Blut beträgt dagegen 1,8-7,7 Zellen pro nl. Die Zellkonzentration der Versuchslösung in den Experimenten überstieg also die physiologische Konzentration von Neutrophilen Granulozyten um mehr als den Faktor 10^3 . Diese unphysiologisch hohe Zellkonzentration war erforderlich, da nur dadurch ein Nachweis von Phospho-VASP mit Hilfe des Antikörpers 16C2 möglich war. Das lag daran, dass sich der Antikörper 16C2 nicht als sehr sensibel erwiesen hat. Der Nachweis von Phospho-VASP mit Hilfe des Antikörpers 5C6 war hingegen auch bei niedrigeren Zellkonzentrationen möglich. Um eine Standardisierung und Vergleichbarkeit der Experimente zu erreichen, wurde jedoch die Konzentration von 10^7 Zellen pro μl in allen Experimenten verwendet.

Ein Aliquot der Neutrophilensuspension wurde im Wasserbad bei 37°C stimuliert. Vor der Stimulation sowie zu den Zeitpunkten 0,5, 1, 3 und 5 Minuten (bei der Stimulation mit cGMP-Analog 8-pCPT-cGMP zu den Zeitpunkten 20, 30 und 40 Minuten) wurde die Stimulation mit der gleichen Menge SDS-Stopplösung unterbrochen. Anschließend wurden die Aliquots für 10 Minuten bei 100°C gekocht, um die Denaturierung der Proteine zu erreichen und das Aufbewahren der Aliquots bei -20°C bis zur Auftrennung durch Gelelektrophorese zu ermöglichen.

4.3 Western Blot

Western Blot-Prinzip:

Western Blot ist eine Methode zum Nachweis eines Proteins mit einem spezifischen Antikörper. Seinen Namen hat es als scherzhafte Wortneuschöpfung erhalten in Anlehnung an Southern Blot, welches eine Methode zum Nachweis der RNA darstellt. Diese Methode ist von E.M. Southern zum ersten Mal beschrieben worden und wird nach seinem Namen bezeichnet.

Als antigenhaltige Festphase werden Blotstreifen verwendet, die elektrophoretisch aufgetrennte Antigengemische (hier Proteine der Neutrophilen Granulozyten) enthalten. Die Position der Proteine ist dabei hauptsächlich von ihrem Molekulargewicht abhängig, aber auch von der Form und Ladung der Moleküle.

Im ersten Inkubationsschritt binden sich die Primärantikörper an die nachzuweisenden Antigene. Im zweiten Inkubationsschritt reagieren diese Antikörper mit Peroxidase-konjugierten anti-Maus- oder mit anti-Kaninchen-Antikörpern, je nach dem von welcher Spezies der Primärantikörper stammt. Im dritten Inkubationsschritt werden die gebundenen Antikörper durch eine Inkubation mit ECLTM-Lösung dargestellt. ECLTM enthält als Hauptkomponenten Peracid, Luminol und einen Lichtemissionsverstärker. Nach der Oxidation des Peracids durch an dem Sekundärantikörper gebundene Peroxidase kommt es zu einem Luminiszenzeffekt. Chemiluminiszierende Banden können mit Hilfe von Röntgenfilmen detektiert werden.

Experimentdurchführung:

a) Elektrophoretische Auftrennung der Proteine

Bei der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine auf eine Trägersubstanz aufgebracht und in einer Pufferlösung bei konstantem pH einem elektrischen Feld ausgesetzt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine ist dabei abhängig von der angelegten Spannung, Eigenschaften der Trägersubstanz, Ladung der Moleküle und auch deren Form.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte durch SDS-Polyacrylamidelektrophorese nach Laemmli (1979). Dabei wurden die Proteine zuerst in einem Sammelgel konzentriert und anschließend in einem Trenngel entsprechend den oben genannten Faktoren aufgetrennt. Zur Auftrennung wurde eine BioRad Protein II Kammer verwendet. Die Konzentrierung der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 80 V. Die Auftrennung der Proteine fand bei 150 V statt.

b) Transfer der Proteine vom Gel auf Nitrocellulose- oder PVDF-Transfermembran

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde ein Transfer auf eine Nitrozellulose- oder eine PVDF-Transfermembran durchgeführt. Die PVDF-Transfermembran musste im Gegensatz zur Nitrozellulose-Transfermembran vor dem Benutzen mit Methanol aktiviert werden. Das Trenngel wurde in einem Transferpuffer mit einer Nitrocellulose- oder PVDF-Transfermembran bedeckt. Anschließend wurden das Trenngel und eine der Membranen zwischen zwei Schichten Whatmann-Papier in einer Kunststoffvliese festgeklemmt. Der Transfer der Proteine erfolgte in einer Blotkammer bei 4°C durch vertikal zum Gel für 1,5 Stunden angelegten Strom von 1 A. Diese niedrige Temperatur war notwendig, da nur so eine Diffusion der Proteine verhindert werden konnte.

c) Nachweis von Proteinen auf der Nitrocellulose- oder PVDF-Transfermembran

Durch Anfärben der Nitrocellulose- oder PVDF-Transfermembran mit „Ponceau-Rot“ war ein direkter Nachweis der Proteine auf der Membran möglich. Die Nitrocellulose- oder PVDF-Transfermembran wurde für ca. 5 Minuten in die „Ponceau-Rot“-Lösung gelegt und dann mit destilliertem Wasser abgespült. Die Proteine stellten sich als deutliche Bandenmuster dar. Um die Anfärbung der Proteinenbanden wieder zu entfernen, wurde die Nitrocellulose- oder PVDF-Transfermembran drei Mal hintereinander für jeweils 10 Minuten mit TBS/Tween gewaschen.

Anschließend 45-minütige Inkubation der Nitrocellulose- oder PVDF-Transfermembran im Blockmedium aus 6% Milch in TBS/Tween führte zur Sättigung der unspezifischen Bindungsstellen.

d) Inkubation mit primärem und sekundärem Antikörper

Nach dem Entfernen des Blockmediums erfolgte die Inkubation mit spezifischem Antikörper, dessen Konzentration je nach Versuch und nach dem nachzuweisenden Protein unterschiedlich war. Die Konzentrationen der Primärantikörper sind der Tabelle 3.1.1 zu entnehmen.

Die Nitrocellulose- bzw. PVDF-Transfermembran wurde in 10 ml 3%-iger TBS/Tween-Lösung mit erforderlicher Antikörperkonzentration bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde sie drei Mal hintereinander für jeweils 10 Minuten mit TBS/Tween gewaschen.

Danach wurde die Nitrocellulose- bzw. die PVDF-Transfermembran in 10 ml 3%-iger TBS/Tween-Lösung mit erforderlicher Konzentration des Sekundärantikörpers für 45 Minuten inkubiert. Die Konzentrationen der sekundären Antikörper können der Tabelle 3.1.2 entnommen werden. Anschließend erfolgte fünfmaliges Waschen der Nitrocellulose- bzw. PVDF-Transfermembran für jeweils 10 Minuten mit TBS/Tween.

e) Nachweis der spezifischen Proteinbanden

Die Nitrocellulose- bzw. die PVDF-Transfermembran wurde nach dem Anfärben mit sekundärem Antikörper für 5 Minuten mit der ECL-Lösung inkubiert, dann zwischen zwei durchsichtigen Folien eingeschlossen. In einer dunklen Kammer wurde ein Röntgenfilm auf die zwischen zwei Folien eingeschlossene Membran aufgelegt, wobei es zur Belichtung und dadurch bedingter Schwärzung des Films kam. Die entwickelten Filme wurden mit Hilfe des Programms PhotoLook eingescannt und mit Hilfe des Programms NIH Image analysiert. Dabei war die Belichtungsstärke direkt proportional zu der spezifischen Proteinmenge der untersuchten Probe.

4.4 Strippen von Western Blot

Um die gebundenen Antikörper von der Nitrocellulose- bzw. der PVDF-Transfermembran zu entfernen, wurden die Western Blots in dem Stripp-Puffer bei 56°C und ständigem Schütteln im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte mehrmaliges Waschen im TBS/Tween und 45-minütige Inkubation im Blockmedium aus 6% Milch in TBS/Tween zur Sättigung der unspezifischen Bindungsstellen. Nach diesem Verfahren gestripptes Blot wurde z.B. zum „Loading Control“ verwendet.

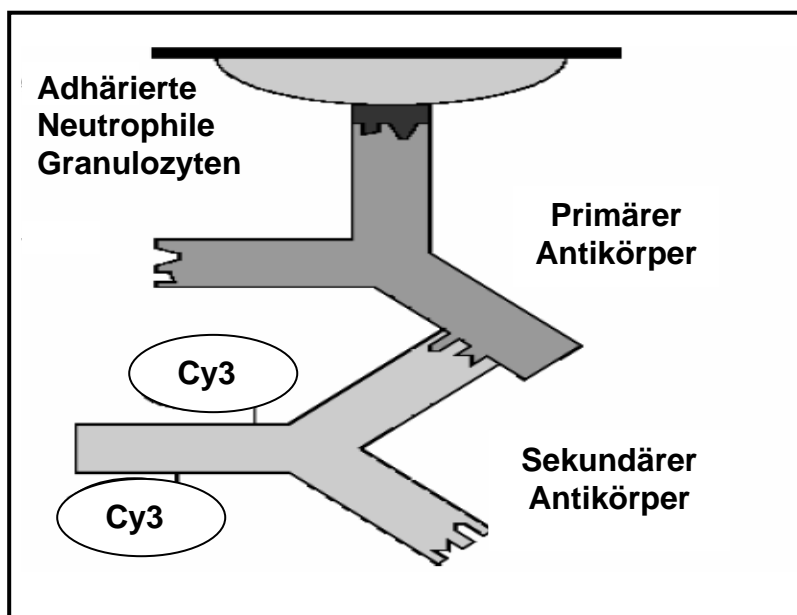
4.5 Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von intrazellulären Proteinen in Neutrophilen Granulozyten

Immunfluoreszenz-Prinzip:

Als Antigene für die Immunfluoreszenz dienen intrazelluläre Proteine der an die Plastikoberfläche der Objektträger einer „Lab-Tek®-Kammer“ adhären und fixierten humanen Neutrophilen Granulozyten. Im ersten Inkubationsschritt binden sich die primären Antikörper an die nachzuweisenden Proteine. Im zweiten Inkubationsschritt werden diese Antikörper mit Cy3-markierten anti-Maus-IgG-

Antikörpern sichtbar gemacht und die Fluoreszenz unter Deckgläsern mit Moviol Fluorescent Mounting Medium fixiert. Die Fluoreszenz wird anschließend im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Ihre Stärke und Lokalisation entspricht dem Gehalt und der Lokalisation des nachzuweisenden Proteins.

Abb. 4.5.1 Prinzip der Immunfluoreszenz:



Experimentdurchführung:

a) Adhäsion der Neutrophilen Granulozyten auf die Objektträgern

Neutrophile Granulozyten wurden wie im Kapitel 4.1 beschrieben isoliert und mit einem GBSS-Puffer auf eine Konzentration von 10^7 Zellen pro μl eingestellt.

Eine Stunde bevor die Isolierung von Neutrophilen Granulozyten abgeschlossen war, wurde ein Teil des GBSS-Puffers mit humanem Serum im Verhältnis 1:1 gemischt, jeweils 1,5 ml dieses Gemisches auf Objektträger einer „Lab-Tek®-Kammer“ gegeben

und bei 37°C eine Stunde inkubiert. Das Serum stammte von dem gleichen Spender wie die Neutrophilen Granulozyten. Nach Ablauf der Inkubation wurde das Gemisch von der Oberfläche der Objektträger vorsichtig abgesaugt, die Objektträger der „Lab-Tek®-Kammer“ mit dem GBSS-Puffer ohne humanes Serum gespült und auf jeden Objektträger jeweils 100 µl der Suspension aus Neutrophilen Granulozyten aufgetragen, so dass die Neutrophilen Granulozyten an die Oberfläche der Objektträger adhärten. Nach einer Einwirkzeit von 10 Minuten wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt. Ein Teil der Objektträger mit adhärten Neutrophilen Granulozyten wurde mit 10 µM PG-E₁-Lösung für 3 Minuten beschichtet.

b) Fixieren der adhärten Neutrophilen Granulozyten auf den Objektträgern

Objektträger mit adhärten Neutrophilen Granulozyten wurden zuerst für 10 Minuten mit 1% Paraformaldehyd in PBS (mit 0.72% Sucrose) und dann für 10 Minuten in 3,7% Formaldehyd bei Raumtemperatur behandelt. Anschließend erfolgte dreimaliges Waschen der Objektträger mit PBS. Nun wurden die Objektträger mit Methanol für 4 Minuten und nach dem Entfernen des Methanols mit Aceton für 1 Minute beschichtet, beides bei -20°C. Danach erfolgte eine 10-minütige Inkubation der Objektträger bei Raumtemperatur im Blockmedium, bestehend aus 50 mM NH₄Cl in PBS. Das diente zur Sättigung der unspezifischen Bindungsstellen der Proteine in den Neutrophilen Granulozyten. Demselben Zweck diente auch die anschließende 20-minütige Inkubation der Objektträger im Blockmedium, welches aus PBS mit humanem Serum im Verhältnis 1:1 bestand. Beides erfolgte bei Raumtemperatur.

c) Inkubation mit primärem und sekundärem Antikörper

Nach dem Entfernen des Blockmediums erfolgte eine 1-stündige Inkubation mit spezifischem Antikörper. Dieser wurde im Medium aus PBS und humanem Serum im Verhältnis 1:1 aufgelöst. Die Konzentrationen der Antikörper können der Tabelle 3.1.1 entnommen werden.

Nach 3-maligem Waschen der Objektträger mit PBS-Lösung erfolgte eine 30-minütige Anfärbung mit sekundärem Cy3-markierten Antikörper. Auch hier wurde ein Medium aus PBS und humanem Serum im Verhältnis 1:1 zur Antikörperauflösung verwendet. Die Cy3-markierten Antikörper sind äußerst lichtempfindlich, deshalb darf die Anfärbung ausschließlich im Dunkeln stattfinden. Die Konzentration des sekundären Antikörpers kann der Tabelle 3.1.2 entnommen werden. Nach dem Anfärben erfolgte wieder 3-maliges Waschen der Objektträger mit PBS-Lösung.

d) Vorbereitung der Objektträger zum Mikroskopieren

Die Objektträger mit bereits adhären, fixierten und angefärbten Neutrophilen Granulozyten wurden mit 18 µl Moviol Fluorescent Mounting Medium beschichtet und mit den Deckgläschen bedeckt. Bis zum Mikroskopieren wurden die Objektträger bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Auf den Objektträgern adhären Neutrophilen Granulozyten wurden anschließend mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops mikroskopiert und fotografiert.

5. Ergebnisse

5.1. VASP-Phosphorylierung in intakten humanen Neutrophilen Granulozyten nach Stimulation durch Vasodilatoren.

Das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) ist das am besten charakterisierte Substrat der cAMP-abhängigen Proteinkinase (auch A-Kinase oder PKA genannt) und der cGMP-abhängigen Proteinkinase (auch als G-Kinase oder PKG bezeichnet). In der Literatur ist der Nachweis von VASP aus den Thrombozyten der Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen schon seit längerer Zeit beschrieben worden (Halbrügge and Walter, 1989; Halbrügge et al., 1990). Auch aus Thrombozyten Gesunder (Egenthaler et al., 1992) und aus anderen Zellen z.B. aus Neutrophilen Granulozyten (Egenthaler et al., 1994), den Endothelzellen der Gefäße, den Fibroblasten, den Kardiomyozyten und glatten Muskelzellen ist VASP isoliert worden (Holt et al., 1998; Smolenski et al., 2000; Draijer, 1995; Halbrugge und Walter, 1989).

Die cAMP-abhängige-PK und die cGMP-abhängige-PK werden, wie der Name dieser Kinasen schon sagt, mit steigenden cAMP- bzw. cGMP-Konzentration in der Zelle aktiviert (Sandberg et al., 1991; Butt et al., 1992). Zu diesem intrazellulären Anstieg von cAMP bzw. cGMP kommt es nach Aktivierung eines Signalkopplungsproteins, das auch als G-Protein bezeichnet wird. Dies wird durch Bindung verschiedener physiologischer und pharmakologischer Wirkstoffe an den spezifischen Rezeptoren erreicht. Die Funktion der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ist im Kapitel „Einleitung“ ausführlich beschrieben. Zu cAMP-erhöhenden Substanzen gehören viele Vasodilatoren wie z.B. Prostaglandin E₁, welches vom Endothel sezerniert wird und bei Gefäßverschlüssen therapeutisch eingesetztes Prostaglandin I₂ (Flolan®). Zu cGMP-erhöhenden Substanzen gehören Nitrovasodilatoren wie z.B. das häufig in der Klinik eingesetzte Glyzeroltrinitrat (Nitrolingual®) und in der vorliegenden Arbeit verwendeter synthetisch hergestellter NO-Donor SNP (Natriumnitroprussid). PG-E₁, Flolan und SNP wurden in unseren Experimenten zur Stimulation von Neutrophilen Granulozyten verwendet. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente ist auch cGMP-Analog (8-pCPT-cGMP) verwendet

worden. 8-pCPT-cGMP ist ein synthetisch hergestelltes Analog des intrazellulären Signalmoleküls cGMP. Im Gegensatz zum natürlichen cGMP ist das Analog wesentlich lipophiler und kann deshalb durch die Zellmembran diffundieren und für die Stimulation intakter Zellen verwendet werden.

VASP besitzt drei Phosphorylierungsstellen: Serin-157, Serin-239 und Threonin-278. Diese Stellen werden gemeinsam von PKA und PKG genutzt. Verschiedene Affinität der Kinasen zu den VASP-Phosphorylierungsstellen in Thrombozyten ist schon seit langem nachgewiesen worden (Butt et al., 1994; Smolenski et al. 1998). So hat PKG viel stärkere Affinität zu Serin-239 als PKA, PKA jedoch viel stärkere Affinität zu Serin-157 als PKG. Threonin-278 wird durch beide Kinasen wesentlich langsamer phosphoryliert als Serin-157.

Für die Neutrophilen Granulozyten blieb es bis jetzt noch ungeklärt, ob diese Zellen beide Kinasen enthalten und welche Affinität diese Kinasen in Bezug auf die VASP-Phosphorylierung haben. Auch Untersuchungen zu der Kinetik der VASP-Phosphorylierung unter Einwirkung von Vasoaktiven Substanzen blieben bis jetzt noch aus, im Unterschied zu der Phosphorylierungskinetik in den Thrombozyten.

Folgende Experimente setzen es sich zum Ziel, die Wirkung der Vasoaktiven Substanzen in Bezug auf die VASP-Phosphorylierung an Serin-157 und an Serin-239 und die Kinetik dieser Phosphorylierung zu untersuchen.

Wie im Kapitel „Methoden“ ausführlich beschrieben, erfolgte der Nachweis der VASP-Phosphorylierung in den nachfolgenden Experimenten mit Hilfe der Western Blot-Technik. VASP-Phosphorylierung und die Phosphorylierungskinetik der einzelnen Phosphorylierungsstellen dieses Proteins konnten unter Verwendung der monoklonalen phosphorylierungsspezifischen Antikörper untersucht werden. Der verwendete monoklonale Antikörper 16C2 erkennt nur das Serin-239-Phospho-VASP, der monoklonale Antikörper 5C6 dagegen nur das Serin-157-Phospho-VASP. Die Phosphorylierung des Serin-157 bewirkt eine Änderung des Laufverhaltens von VASP in SDS-Polyacrylamidgelen, so dass VASP nicht mehr als eine 46 kDa-Bande, sondern als eine 50 kDa-Bande erscheint. Da der Antikörper 16C2 unabhängig von

der Phosphorylierung von Serin-157 bindet, detektiert es an Serin-239-phosphoryliertes VASP in beiden Banden.

5.1.1 VASP-Phosphorylierung nach Stimulation mit cAMP-erhöhenden Substanzen

Prostaglandine gehören im Körper des Menschen zu den Entzündungsmediatoren. Sie sind Derivate der Arachidonsäure und entstehen in fast allen Zellen des Körpers nach jeder Zellschädigung. Dabei kommt es zur Aktivierung der Phospholipase A₂ (PLA₂) mit nachfolgender Bildung der Arachidonsäure. Aus der Arachidonsäure entstehen dann über den Zyklooxygenaseweg Prostaglandine, Prostazykline oder, wie in Thrombozyten, auch Thromboxane.

Je nach Struktur entfalten die einzelnen Prostaglandine unterschiedliche Wirkungen auf die umgebenden Zellen. Alle Prostaglandine haben jedoch die Fähigkeit, die glatte Muskulatur des Darmes und des Uterus zur Kontraktion zu bringen und die Bildung von cAMP und cGMP zu beeinflussen. Die Wirkung der Prostaglandine im Körper ist nur auf die nächste Umgebung beschränkt, da ihre Halbwertszeit im Blut nur wenige Minuten beträgt.

Prostaglandine der E-Reihe, dazu gehört PG-E₁, sensibilisieren Schmerzrezeptoren und verursachen einen Anstieg der Körpertemperatur. Sie fördern auch die Durchblutung des Körpers durch Vasodilatation. PG-E₁ hat auch eine Wirkung als Thrombozytenaggregationshemmer. Die im menschlichen Körper physiologisch vorkommenden Prostaglandine werden von Endothelzellen sezerniert.

Flolan (PG-I₂) gehört zu der Gruppe der Prostazykline und ist ein starker Thrombozytenaggregationshemmer und Vasodilatator.

PG-E₁ und Flolan interagieren mit spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Tsai et al., 1989). Durch Bindung dieser Wirkstoffe an den Rezeptoren kommt es zur

Aktivierung der Adenylatzyklase (AC) mit nachfolgender intrazellulärer cAMP-Synthese.

a) Stimulation mit PG-E₁

Neutrophile Granulozyten wurden mit PG-E₁ in Konzentrationen von 10 µM und 1 µM stimuliert. Vor der Stimulation sowie auch nach 0.5, 1, 3 und 5 Minuten wurden Aliquots entnommen und der Grad der VASP-Phosphorylierung mit Hilfe der Antikörper 5C6 und 16C2 bestimmt.

Die Ergebnisse der Experimente sind in den Abbildungen 5.1.1 bis 5.1.4 dargestellt.

Die Stimulation der Neutrophilen Granulozyten mit 10 µM PG-E₁ ergab eine Erhöhung der Menge von Serin-239-Phospho-VASP (nachgewiesen mit Antikörper 16C2) auf mehr als das 20-fache des Basalwertes (siehe Abbildung 5.1.2), dieser Höchstwert wurde nach 5 Minuten der Stimulation erreicht. In Konzentration von 1 µM war PG-E₁ weniger wirksam (Data nicht gezeigt).

Die Menge von Serin-157-Phospho-VASP hat sich unter dem Einfluss von 10 µM PG-E₁ auf mehr als das 2-fache des Basalwertes vergrößert (siehe Abbildung 5.1.3). Dieser Höchstwert wurde im Durchschnitt nach 3 Minuten der Stimulation erreicht. In einer Konzentration von 1 µM war PG-E₁ auch in diesem Fall weniger wirksam (Data nicht gezeigt).

Abbildung 5.1.1 zeigt typische Western Blots, die die Abhängigkeit der VASP-Phosphorylierung von der Zeit darstellen. Dieser Abbildung sowie auch den Abbildungen 5.1.2 und 5.1.3 ist zu entnehmen, dass PG-E₁ eine VASP-Phosphorylierung an Serin-157 sowie auch an Serin-239 hervorruft. Die Zunahme der VASP-Phosphorylierung im Vergleich zu den Basalwerten ist an Serin-239 ca. 7-fach stärker als an Serin-157. Der Proteinnachweis zu den beschriebenen Versuchen ist in der Abbildung 5.1.4 dargestellt und zeigt die gleiche Proteinmenge in allen Banden des Western Blots.

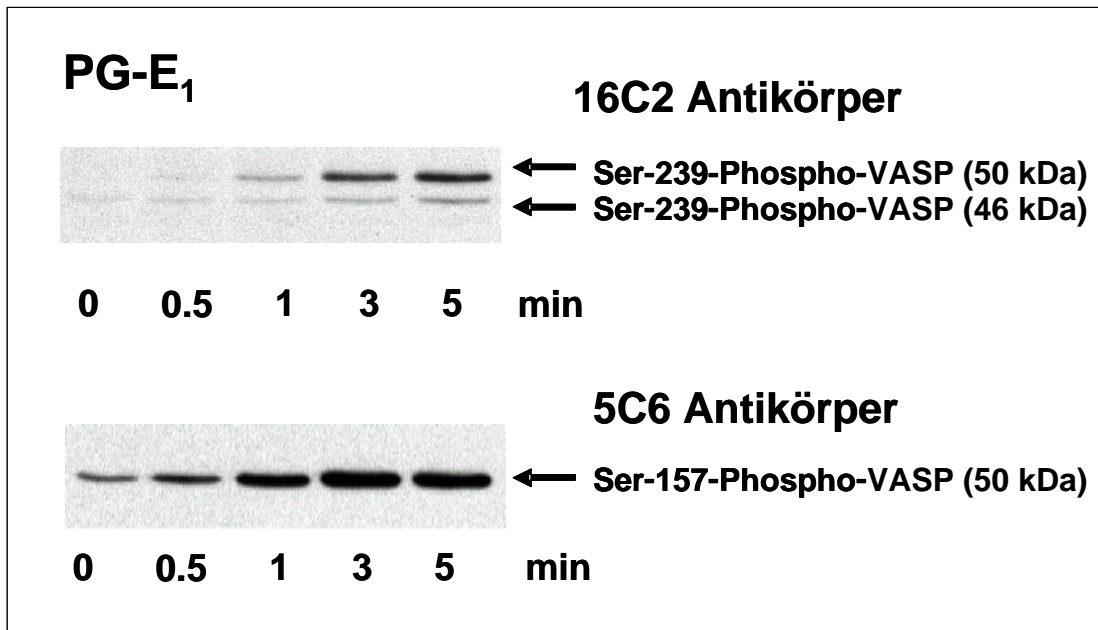


Abbildung 5.1.1

Abhängigkeit der VASP-Phosphorylierung von der Zeit.

Isolierte Neutrophile Granulozyten wurden mit 10 μ M PG-E₁ stimuliert. Vor der Stimulation (Zeitpunkt 0 Minuten) sowie nach 0.5, 1, 3 und 5 Minuten wurden Aliquots entnommen und die Stimulierungsreaktion mit gleicher Menge SDS-Stopplösung unterbrochen. Die VASP-Phosphorylierung wurde mit den Antikörpern 16C2 und 5C6 mittels der Western Blot-Technik nachgewiesen. Dieser Abbildung ist zu entnehmen, dass PG-E₁ eine VASP-Phosphorylierung an Serin-157 sowie auch an Serin-239 hervorruft. Die dargestellten Blots sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente.

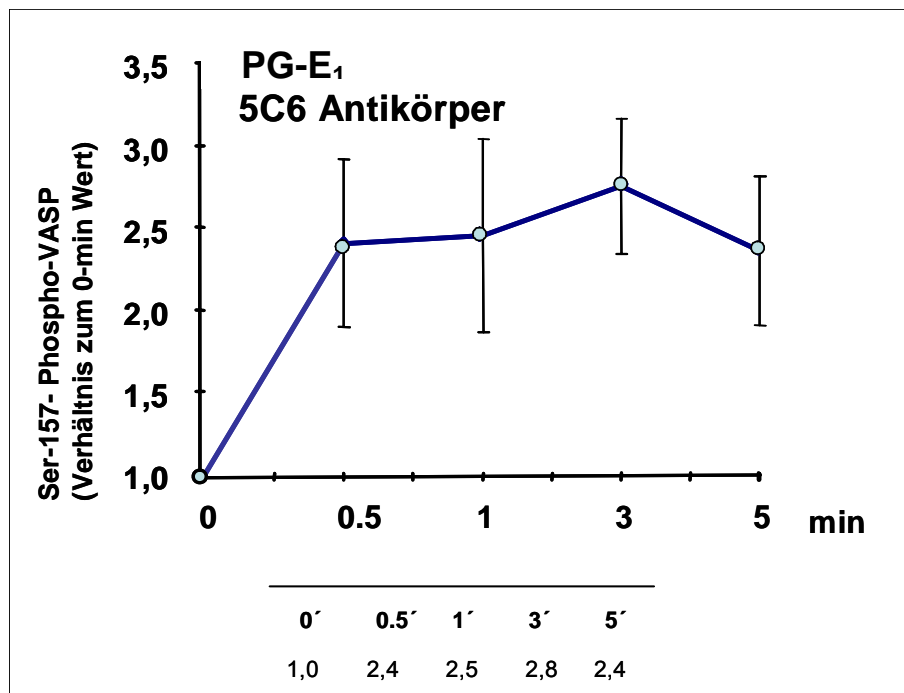
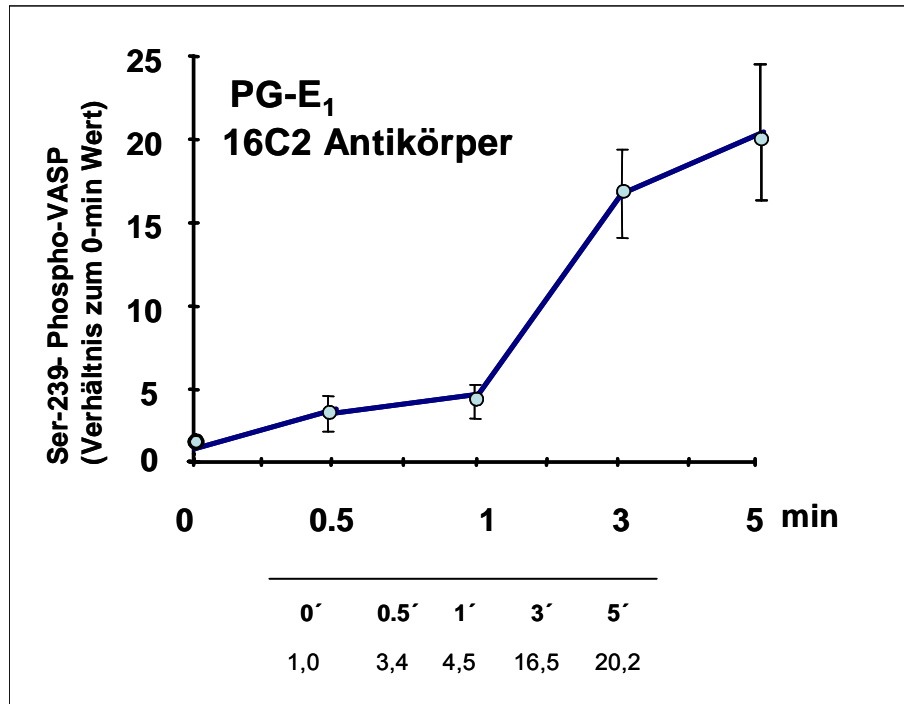


Abbildung 5.1.2 und 5.1.3

Quantitative Analyse der VASP-Phosphorylierung unter der Einwirkung von 10 μM PG-E₁. Die Diagramme fassen drei voneinander unabhängige Experimente zusammen. Dargestellt ist die Zuwachsrates der VASP-Phosphorylierung ($\pm\text{SEM}$ des Mittelwertes) in Bezug auf den 0-Minuten Wert.

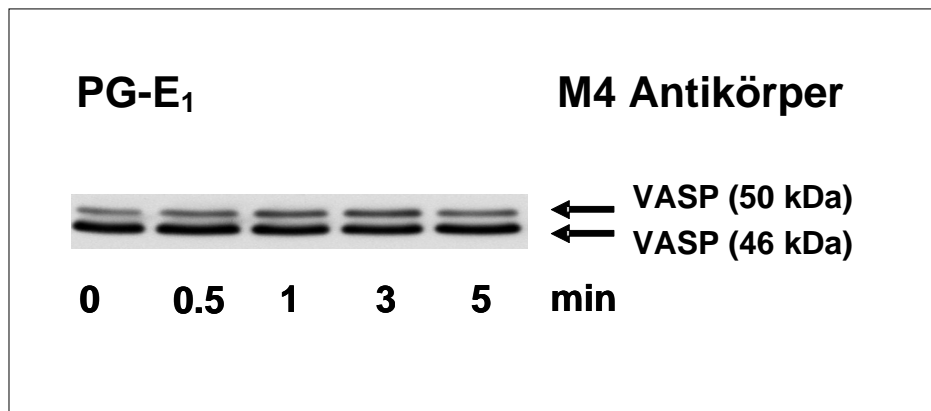


Abbildung 5.1.4

Proteinnachweis zu den in Abbildung 5.1.1 dargestellten Western Blots.

Dieser Proteinnachweis wurde mit einem phosphorylierungsunabhängigen Antikörper gegen VASP (M4) angefärbt und weist die gleiche Proteinmenge in allen Banden nach.

Fazit: Einwirkung von PG-E₁ ruft VASP-Phosphorylierung an Serin-157 und an Serin-239 hervor.

Zur Erklärung dieses Ergebnisses sei auf Kapitel 7 „Diskussion“ verwiesen.

b) Stimulation mit Flolan

Neutrophile Granulozyten wurden mit Flolan in Konzentrationen von 10 μM und 1 μM stimuliert. Vor der Stimulation sowie auch nach 0.5, 1, 3 und 5 Minuten wurden Aliquots entnommen und der Grad der VASP-Phosphorylierung mit Hilfe der Antikörper 5C6 und 16C2 bestimmt.

Die Ergebnisse der Experimente sind in den Abbildungen 5.1.5 bis 5.1.8 dargestellt.

Die Stimulation der Neutrophilen Granulozyten mit 10 μM Flolan ergab eine Erhöhung der Menge von Serin-239-Phospho-VASP (nachgewiesen mit Antikörper 16C2) auf mehr als das 7-fache des Basalwertes (siehe Abbildung 5.1.6). Dieser Höchstwert wurde nach 3 Minuten der Stimulation erreicht. In einer Konzentration von 1 μM war Flolan weniger wirksam (Data nicht gezeigt).

Die Menge von Serin-157-Phospho-VASP hat sich unter dem Einfluss von 10 μM Flolan auf mehr als das 2-fache des Basalwertes vergrößert (siehe Abbildung 5.1.7). Dieser Höchstwert wurde ebenfalls nach 3 Minuten erreicht. Flolan in einer Konzentration von 1 μM war auch in diesem Fall weniger wirksam (Data nicht gezeigt).

Abbildung 5.1.5 zeigt typische Western Blots für die Abhängigkeit der VASP-Phosphorylierung von der Zeit. Dieser Abbildung sowie auch den Abbildungen 5.1.6 und 5.1.7 ist zu entnehmen, dass Flolan eine VASP-Phosphorylierung an Serin-157 und an Serin-239 hervorruft. Die Zunahme der VASP-Phosphorylierung im Vergleich zu den Basalwerten ist an Serin-239 fast 3,5-fach stärker als an Serin-157. Der Proteinnachweis zu den beschriebenen Versuchen ist in der Abbildung 5.1.8 dargestellt und zeigt die gleiche Proteinmenge in allen Banden des Western Blots.

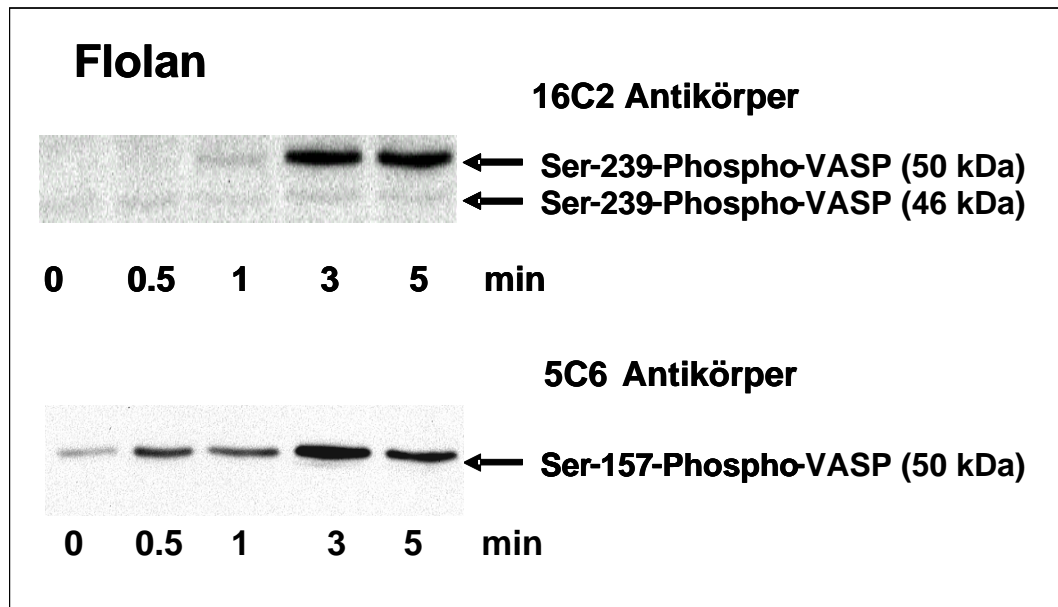
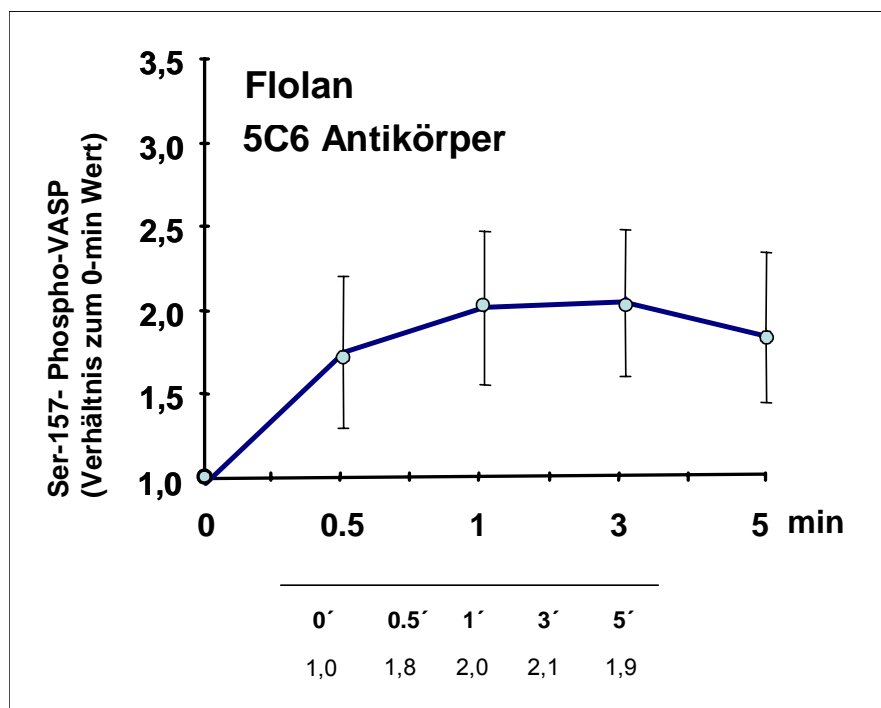
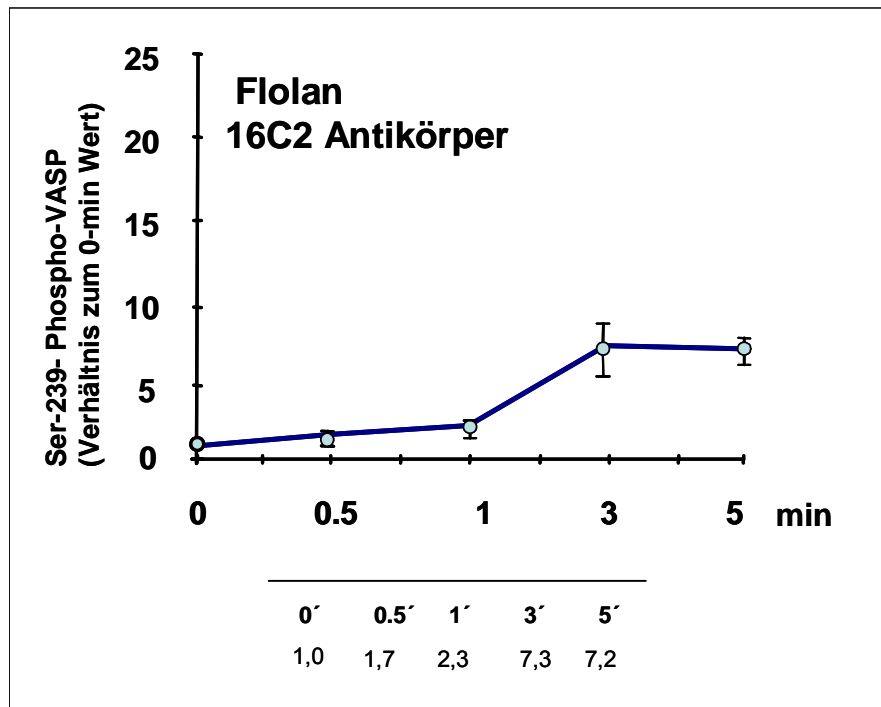


Abbildung 5.1.5

Abhängigkeit der VASP-Phosphorylierung von der Zeit.

Isolierte Neutrophile Granulozyten wurden mit 10 μ M Flolan stimuliert. Vor der Stimulation (Zeitpunkt 0 Minuten) sowie nach 0.5, 1, 3 und 5 Minuten wurden Aliquots entnommen und die Stimulierungsreaktion mit gleicher Menge SDS-Stopplösung unterbrochen. Die VASP-Phosphorylierung wurde mit den Antikörpern 16C2 und 5C6 mittels der Western Blot-Technik nachgewiesen. Dieser Abbildung ist zu entnehmen, dass Flolan eine VASP-Phosphorylierung an Serin-157 sowie auch an Serin-239 hervorruft. Die dargestellten Blots sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente.



Abbildungen 5.1.6 und 5.1.7

Quantitative Analyse der VASP-Phosphorylierung unter der Einwirkung von 10 μM Flolan. Die Diagramme fassen drei voneinander unabhängige Experimente zusammen. Dargestellt ist die Zuwachsrate der VASP-Phosphorylierung ($\pm\text{SEM}$ des Mittelwertes) in Bezug auf den 0-Minuten Wert.

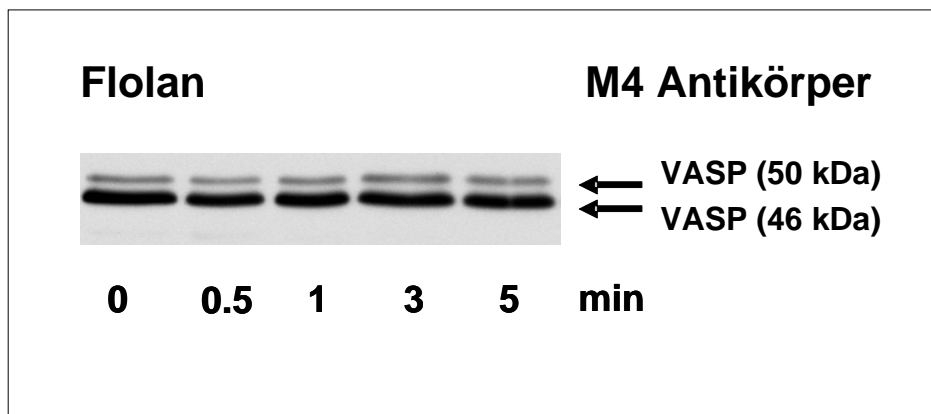


Abbildung 5.1.8

Proteinnachweis zu den in Abbildung 5.1.5 dargestellten Western Blots.

Dieser Proteinnachweis wurde mit einem phosphorylierungsunabhängigen Antikörper gegen VASP (M4) angefärbt und weist die gleiche Proteinmenge in allen Banden

Fazit: Einwirkung von Flolan ruft VASP-Phosphorylierung an Serin-157 und an Serin-239 hervor.

Zur Erklärung dieses Ergebnisses sei auf Kapitel 7 „Diskussion“ verwiesen.

5.1.2 VASP-Phosphorylierung nach Stimulation mit cGMP-erhöhenden Substanzen

Im Gegensatz zu humanen Thrombozyten, die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) in hohen Konzentrationen enthalten (Eigenthaler et al., 1992), scheinen humane Neutrophile Granulozyten, wenn überhaupt, nur sehr geringe Mengen an PKG zu besitzen. In intakten Neutrophilen Granulozyten ist bis jetzt noch kein Substrat der PKG eindeutig nachgewiesen worden. Da VASP in humanen Thrombozyten ein gut charakterisiertes Substrat der PKG ist, ergab sich die Frage, ob cGMP-erhöhende Substanzen zu einer VASP-Phosphorylierung in Neutrophilen Granulozyten führen. Das würde einen Hinweis darauf geben, ob PKG eine physiologische Rolle in den Neutrophilen Granulozyten spielt.

SNP (Natriumnitroprussid) ist ein synthetisch hergestellter Donor von NO (Saxon und Kattlove, 1976). In der Literatur wird er auch als „*endothelial-derived relaxing factor*“ (EDRF) bezeichnet (Furchgott und Vanhoutte, 1989). NO wird in vivo von den Endothelzellen, aber auch von den Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten gebildet und ist ein Aktivator der Guanylatzyklase.

a) Stimulation mit SNP

Neutrophile Granulozyten wurden mit 100 μ M SNP stimuliert. Vor der Stimulation sowie nach 0,5, 1, 3 und 5 Minuten wurden Aliquots entnommen und der Grad der VASP-Phosphorylierung mit Hilfe der Antikörper 5C6 und 16C2 bestimmt.

Die Ergebnisse der Experimente sind in den Abbildungen 5.1.9 bis 5.1.12 dargestellt.

Die Stimulation der Neutrophilen Granulozyten mit 100 μ M SNP ergab keine signifikante Erhöhung der Menge von Serin-239-Phospho-VASP (nachgewiesen mit Antikörper 16C2). Das kann den Abbildungen 5.1.9 und 5.1.10 entnommen werden. Die Menge des Serin-157-Phospho-VASP (nachgewiesen mit Antikörper 5C6) hat sich unter dem Einfluss von 100 μ M SNP auf mehr als das 2,5-fache des

Basalwertes vergrößert (siehe Abbildung 5.1.11). Dieser Höchstwert wurde bereits nach 0.5 Minuten erreicht.

Abbildung 5.1.9 zeigt typische Western Blots, die die Abhängigkeit der VASP-Phosphorylierung von der Zeit darstellen. Dieser Abbildung sowie auch den Abbildungen 5.1.10 und 5.1.11 ist zu entnehmen, dass SNP eine VASP-Phosphorylierung an Serin-157, aber nicht an Serin-239 hervorruft. Der Proteinnachweis zu den beschriebenen Versuchen ist in der Abbildung 5.1.12 dargestellt und zeigt die gleiche Proteinmenge in allen Banden des Western Blots.

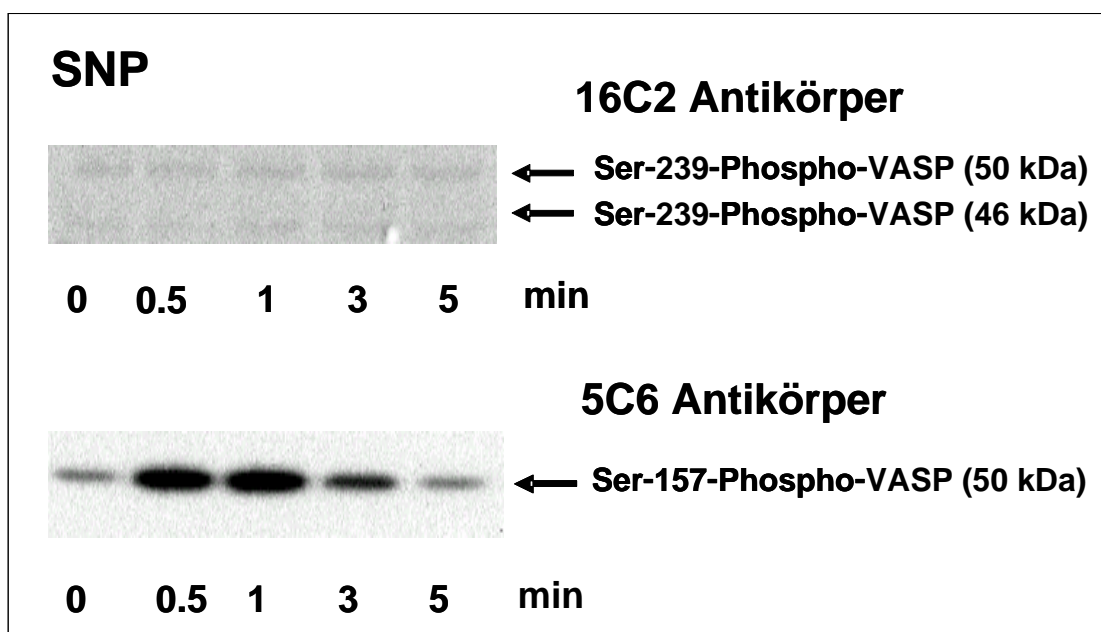
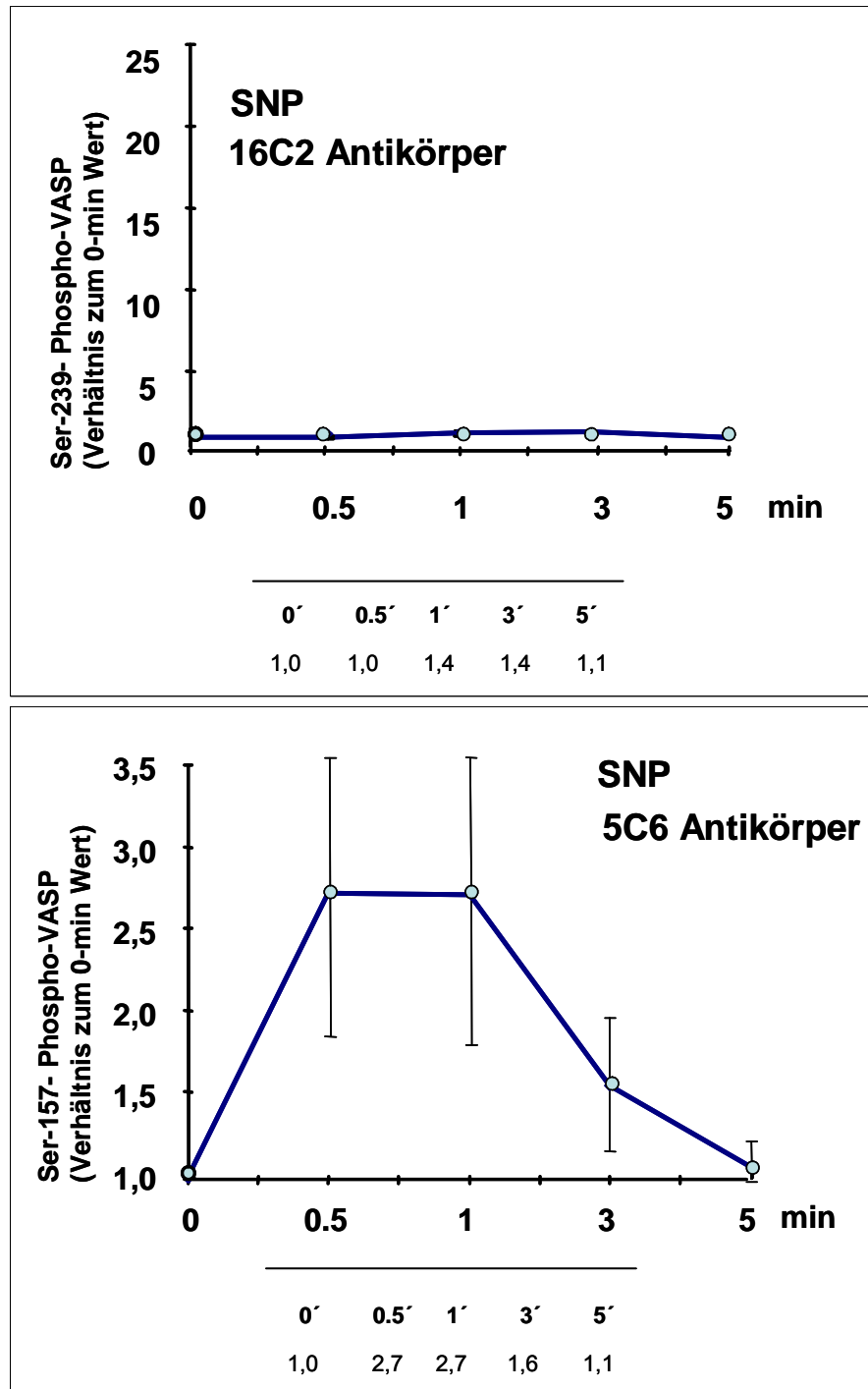


Abbildung 5.1.9

Abhängigkeit der VASP-Phosphorylierung von der Zeit.

Isolierte Neutrophile Granulozyten wurden mit 100 μ M SNP stimuliert. Vor der Stimulation sowie nach 0.5, 1, 3 und 5 Minuten wurden Aliquots entnommen und die Stimulierungsreaktion mit gleicher Menge SDS-Stopplösung unterbrochen. Die VASP-Phosphorylierung wurde mit den Antikörpern 16C2 und 5C6 mittels der Western Blot-Technik nachgewiesen. Dieser Abbildung ist zu entnehmen, dass SNP eine VASP-Phosphorylierung an Serin-157, aber nicht an Serin-239 hervorruft. Die dargestellten Blots sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente.



Abbildungen 5.1.10 und 5.1.11

Quantitative Analyse der VASP-Phosphorylierung unter der Einwirkung von 100 μ M SNP. Die Diagramme fassen drei voneinander unabhängige Experimente zusammen. Dargestellt ist die Zuwachsrate der VASP-Phosphorylierung (\pm SEM des Mittelwertes) in Bezug auf den 0-Minuten Wert.

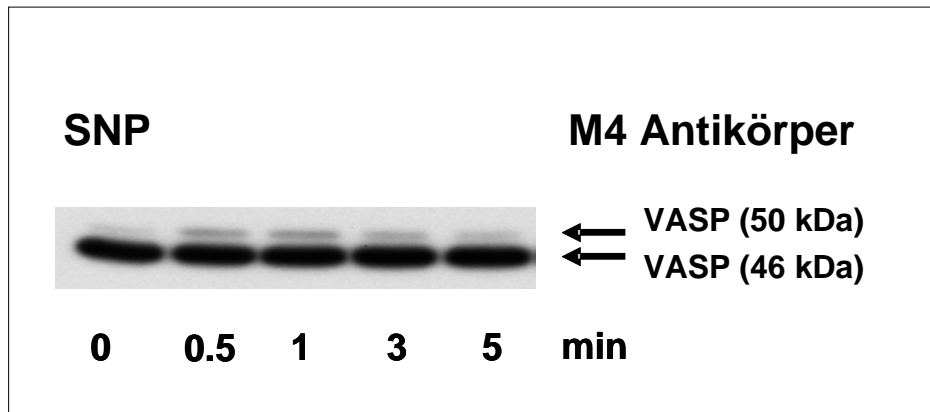


Abbildung 5.1.12

Proteinnachweis zu den in Abbildung 5.1.9 dargestellten Western Blots.

Dieser Proteinnachweis wurde mit einem phosphorylierungsunabhängigen Antikörper gegen VASP (M4) angefärbt und weist die gleiche Proteinmenge in allen Banden nach.

Fazit: Einwirkung von SNP ruft VASP-Phosphorylierung an Serin-157, aber nicht an Serin-239 hervor.

Zur Erklärung dieses Ergebnisses sei auf Kapitel 7 „Diskussion“ verwiesen.

b) Stimulation mit 1 mM cGMP-Analog (8-pCPT-cGMP)

cGMP-Analog (8-pCPT-cGMP) ist ein spezifischer Aktivator der PKG.

Neutrophile Granulozyten wurden mit 1 mM cGMP-Analog (8-pCPT-cGMP) stimuliert. Vor der Stimulation sowie auch nach 20, 30 und 40 Minuten wurden Aliquots entnommen und der Grad der VASP-Phosphorylierung mit Hilfe der Antikörper 5C6 und 16C2 bestimmt. Um seine Wirkung zu entfalten, braucht 8-pCPT-cGMP im Vergleich zu PG-E₁, Flolan und SNP wesentlich länger. Deshalb sind andere Stimulationszeiten für diese Substanz gewählt worden.

Die Ergebnisse der Experimente sind in den Abbildungen 5.1.13 bis 5.1.16 dargestellt.

Die Stimulation der Neutrophilen Granulozyten mit 1 mM cGMP-Analog ergab keine signifikante Erhöhung der Menge von Serin-239-Phospho-VASP (nachgewiesen mit Antikörper 16C2). Die Menge von Serin-157-Phospho-VASP hat sich unter dem Einfluss von 1 mM Analog auf mehr als das 1,5-fache des Basalwertes vergrößert (siehe Abbildung 5.1.14). Dieser Höchstwert wurde nach 30 Minuten erreicht.

Abbildung 5.1.13 zeigt typische Western Blots, die die Abhängigkeit der VASP-Phosphorylierung unter der Einwirkung von 1 mM cGMP-Analog von der Zeit darstellen. Gezeigt werden hier nur die Ergebnisse nach 30-minütiger Stimulation. Dieser Abbildung sowie auch den Abbildungen 5.1.14 und 5.1.15 ist zu entnehmen, dass 1 mM Analog eine VASP-Phosphorylierung an Serin-157, aber nicht an Serin-239 hervorruft. Der Proteinnachweis zu den beschriebenen Versuchen ist in der Abbildung 5.1.16 dargestellt und zeigt die gleiche Proteinmenge in allen Banden des Western Blots.

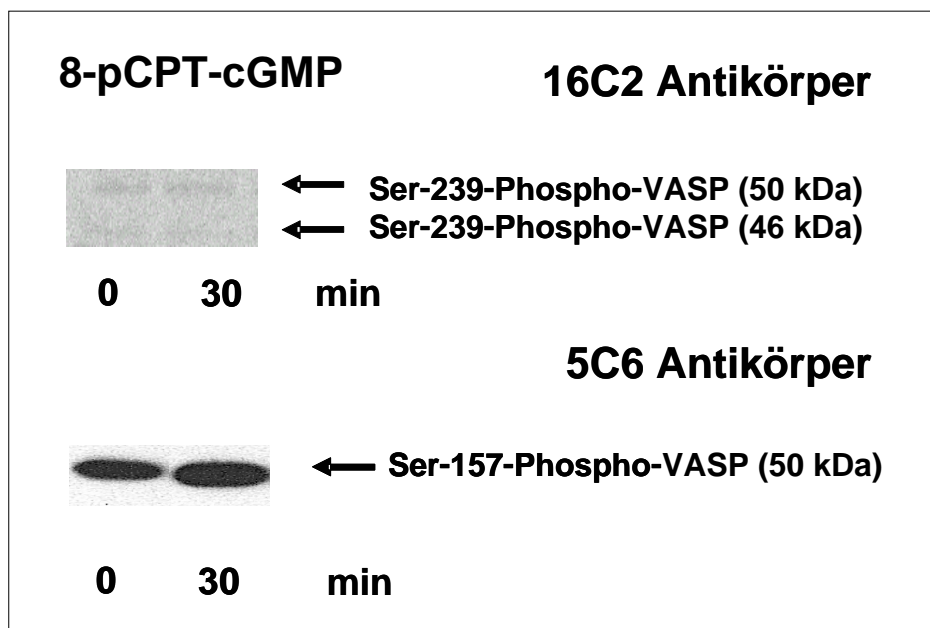


Abbildung 5.1.13

Abhängigkeit der VASP-Phosphorylierung von der Zeit.

Isolierte Neutrophile Granulozyten wurden mit 1 mM cGMP-Analog (8-pCPT-cGMP) stimuliert. Vor der Stimulation und nach 30 Minuten wurden Aliquots entnommen und die Stimulierungsreaktion mit gleicher Menge SDS-Stopplösung unterbrochen. Die VASP-Phosphorylierung wurde mit den Antikörpern 16C2 und 5C6 mittels der Western Blot-Technik nachgewiesen. Dieser Abbildung ist zu entnehmen, dass cGMP-Analog (8-pCPT-cGMP) eine VASP-Phosphorylierung an Serin-157, jedoch nicht an Serin-239 hervorruft. Die dargestellten Blots sind repräsentativ für mindestens zwei voneinander unabhängige Experimente.

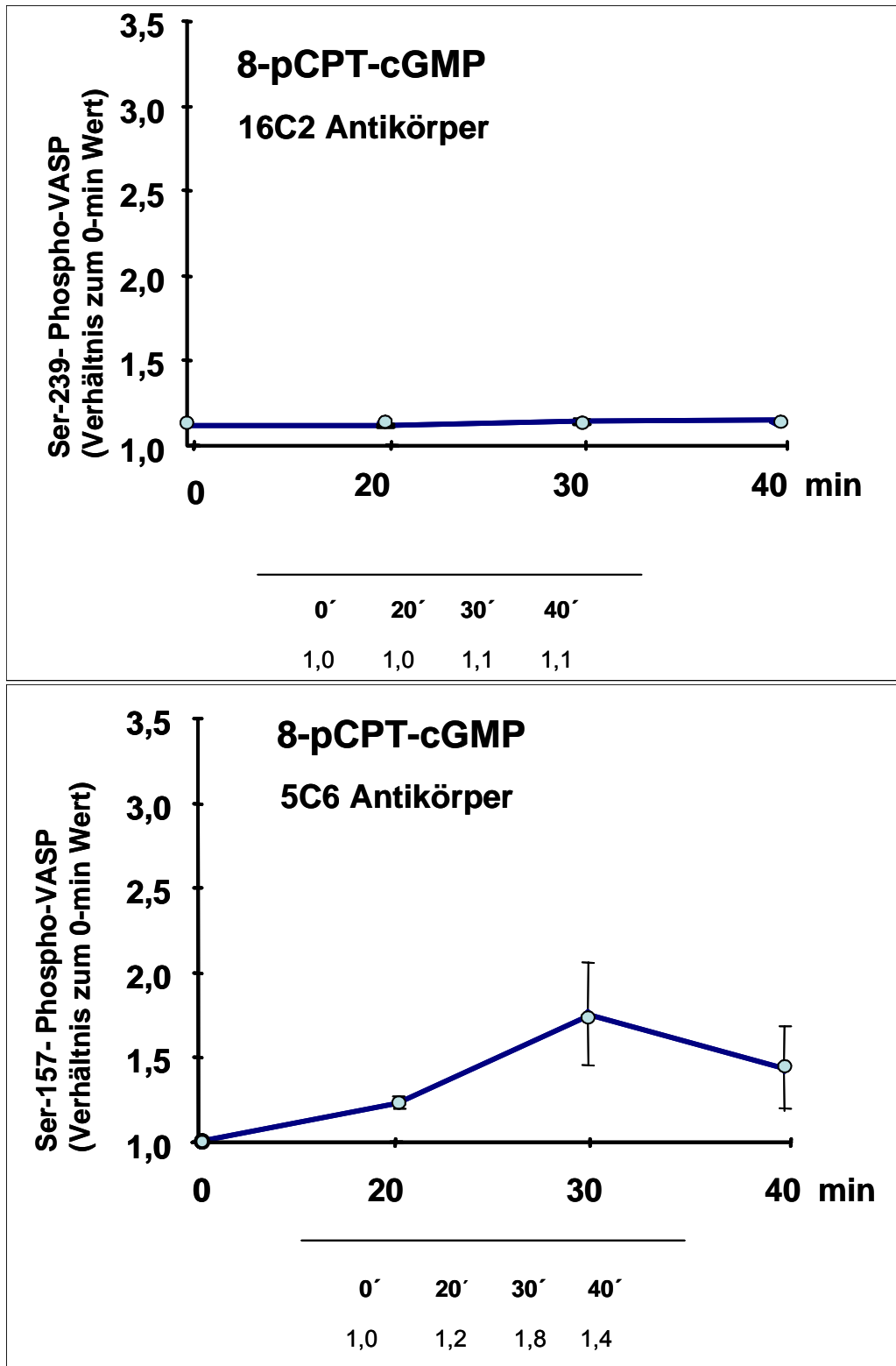


Abbildung 5.1.14 und 5.1.15

Quantitative Analyse der VASP-Phosphorylierung unter der Einwirkung von 1 mM cGMP-Analog (8-pCPT-cGMP). Die Diagramme fassen mindestens zwei voneinander unabhängige Experimente zusammen. Dargestellt ist die Zuwachsrate der VASP-Phosphorylierung in Bezug auf den 0-Minuten Wert.

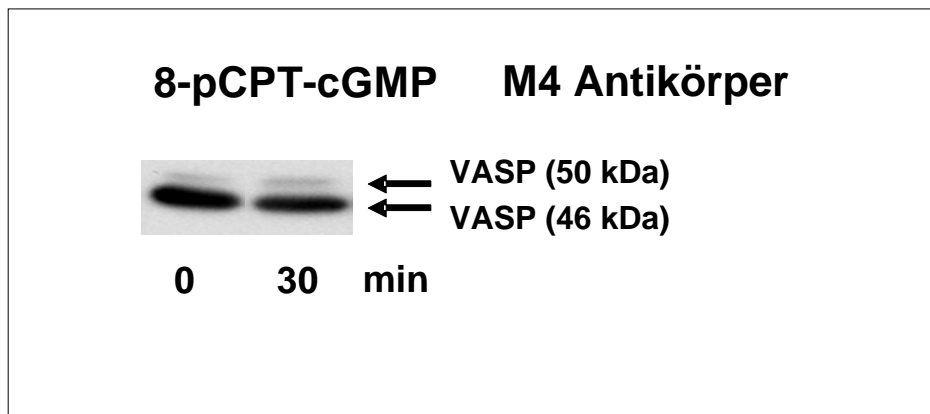


Abbildung 5.1.16

Proteinnachweis zu den in Abbildung 5.1.13 dargestellten Western Blots.

Dieser Proteinnachweis wurde mit einem phosphorylierungsunabhängigen Antikörper gegen VASP (M4) angefärbt und weist die gleiche Proteinmenge in allen Banden nach.

Fazit: Einwirkung von cGMP-Analog (8-pCPT-cGMP) ruft VASP-Phosphorylierung an Serin-157, aber nicht an Serin-239 hervor.

Zur Erklärung dieses Ergebnisses sei auf Kapitel 7 „Diskussion“ verwiesen.

In den Tabellen A und B sind die Ergebnisse aller beschriebenen Experimente zusammengefasst.

Stimulierende Substanz	Relative Rate der Serin-157-VASP-Phosphorylierung (Verhältnis zum 0-min Wert)			
	nach 0.5 min	nach 1 min	nach 3 min	nach 5 min
Flolan 10 µM	1,78	2,05	2,08	1,89
Flolan 1 µM	1,69	1,77	1,74	1,87
PG-E ₁ 10 µM	2,4	2,45	2,75	2,36
PG-E ₁ 1 µM	2,25	2,42	2,20	1,70
SNP 100 µM	2,72	2,72	1,56	1,06
	nach 20 min	nach 30 min	nach 40 min	
cGMP-Analog (8-pCPT-cGMP)	1,21	1,79	1,44	

Tabelle A

Zusammengefasste Darstellung der relativen Raten der Serin-157-VASP-Phosphorylierung in intakten humanen Neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit cAMP- und cGMP-erhöhenden Substanzen. Diese relativen Raten der Serin-157-VASP-Phosphorylierung wurden in Bezug auf den Wert vor der Stimulation (Zeitpunkt 0-Minuten) errechnet. Für die Stimulation mit Prostaglandinen und Nitrovasodilatoren wurden die Zeitpunkte 0.5, 1, 3 und 5 Minuten nach dem Beginn der Stimulation gewählt. Für die Stimulation mit selektivem Aktivator der PKG wurden die Zeitpunkte 20, 30 und 40 Minuten gewählt.

Stimulierende Substanz	Relative Rate der Serin-239-VASP-Phosphorylierung (Verhältnis zum 0-min Wert)			
	nach 0.5 min	nach 1 min	nach 3 min	nach 5 min
Flolan 10 µM	1,65	2,29	7,31	7,19
Flolan 1 µM	1,59	2,28	6,44	6,67
PG-E ₁ 10 µM	3,41	4,50	16,53	20,14
PG-E ₁ 1 µM	2,44	2,92	6,56	7,18
SNP 100 µM	Keine signif. Phosphoryl.	Keine signif. Phosphoryl.	Keine signif. Phosphoryl.	Keine signif. Phosphoryl.
	nach 20 min	nach 30 min	nach 40 min	
cGMP-Analog (8-pCPT-cGMP)	Keine signif. Phosphoryl.	Keine signif. Phosphoryl.	Keine signif. Phosphoryl.	Keine signif. Phosphoryl.

Tabelle B

Zusammenfassung der relativen Raten der Serin-239-VASP-Phosphorylierung in intakten humanen Neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit cAMP- und cGMP-erhöhenden Substanzen. Diese relativen Raten der Serin-239-VASP-Phosphorylierung wurden in Bezug auf den Wert vor der Stimulation (Zeitpunkt 0 Minuten) errechnet. Für die Stimulation mit Prostaglandinen und Nitrovasodilatoren wurden die Zeitpunkte 0.5, 1, 3 und 5 Minuten nach dem Beginn der Stimulation gewählt. Für die Stimulation mit selektivem Aktivator der PKG wurden die Zeitpunkte 20, 30 und 40 Minuten gewählt. 100 µM SNP und cGMP-Analog zeigen keine signifikante Wirkung auf die VASP-Phosphorylierung an Serin-239.

PG-E₁ zeigt im Vergleich zu Flolan wesentlich stärkeren Einfluss auf die Phosphorylierung an Serin-239. Zur Erklärung dieses Ergebnisses sei auf Kapitel 7 „Diskussion“ verwiesen.

5.2 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der VASP-Phosphorylierung

VASP ist mit den intrazellulären Filamenten verschiedener humaner Zellen assoziiert. Es erscheint angereichert an Zell-Zell-Kontaktstellen und an den Kontaktstellen der Zelle mit der Umgebung (sogenannten „*focal contacts*“) (Reinhard et al., 1995). In vielen Zellen ist eine Interaktion von VASP mit zahlreichen Zytoskelettproteinen nachgewiesen worden, dazu gehören Profilin, Zyxin, Vinkulin sowie das Oberflächenprotein ActA des humanpathogenen Bakteriums *Listeria monocytogenes* (Reinhard et al., 1995; Reinhard et al., 1996; Charkraborty et al., 1995). VASP wird eine wichtige Rolle bei der Anordnung des Zytoskeletts zugeschrieben. Zusammen mit anderen Faktoren beeinflusst es vermutlich die Umgestaltung des Aktinzytoskeletts und ist an der Aktivierung des Fibrinogenrezeptors in den Thrombozyten beteiligt. So ließ sich eine gestörte Nucleotid-bedingte Hemmung der Thrombozytenaggregation bei VASP-„knock-out“-Mäusen nachweisen (Aszodi et al., 1999; Hauser et al., 1999). Längere Einwirkung des cGMP-Analogs (8-pCPT-cGMP), einer Substanz die zur VASP-Phosphorylierung führt, auf die Endothelzellen war mit Verkleinerung des Systems der Mikrofilamente und des Vinkulins an den „*focal contacts*“ dieser Zellen assoziiert (Smolenski et al., 2000).

Die genaue Bedeutung von VASP in den Neutrophilen Granulozyten ist noch nicht bekannt. Nach den Untersuchungen von Lawrence und Pryzwansky enthalten runde ruhende Neutrophile Granulozyten dephosphoryliertes VASP. Adhäsion und Ausbreitung der Neutrophilen Granulozyten ist jedoch mit schnellen VASP-Phosphorylierungsvorgängen begleitet. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz konnte auch eine VASP-Umverteilung in Neutrophilen Granulozyten bei ihrer Adhäsion und Ausbreitung nachgewiesen werden. So ließ sich VASP in ruhenden Zellen an der zellulären Kortex nachweisen, während der Zellausbreitung erfolgte eine Umverteilung von VASP in die „*focal contacts*“ der ventralen adhärierenden Zelloberfläche. Doppelfärbung der Neutrophilen Granulozyten mit anti-Phospho-VASP-Antikörper und F-Aktin war beweisend für Co-Lokalisation dieser beiden Substanzen und ließ vermuten, dass VASP am Aufbau des fokalen

Adhäsionskomplexes sowie auch an der Aktinpolymerisation und Bündelung in den Neutrophilen Granulozyten beteiligt ist.

Folgende Versuche setzen es sich zum Ziel, die einzelnen VASP-Phosphorylierungsstellen bei der Adhäsion der Neutrophilen Granulozyten mit Hilfe der monoklonalen anti-Phospho-VASP-Antikörper zu untersuchen. Neutrophile Granulozyten wurden auf die mit humanem Serum des gleichen Spenders beschichtete Oberfläche der „Lab-Tek®-Kammer“ aufgetragen. Nach 10-minütiger Inkubation wurde der Überstand entfernt und die an die Oberfläche adhärennten Neutrophilen Granulozyten mit 1 % Paraformaldehyd und 3,7 % Formaldehyd fixiert (siehe auch Kapitel „Methoden“). Anschließend wurden die Zellen mit Methanol und Aceton behandelt, gewaschen und danach mit Antikörpern angefärbt. Dabei wurde Serin-157-Phospho-VASP mit Hilfe des Antikörpers 5C6 und Serin-239-Phospho-VASP mit Hilfe des Antikörpers 16C2 detektiert. Als Ergebnis dieser Versuche konnte nach einer erfolgten Adhäsion der Neutrophilen Granulozyten an beiden Phosphorylierungsstellen eine deutliche Phosphorylierung festgestellt werden.

Als Vergleich wurden einige Objektträger der „Lab-Tek®-Kammer“ mit bereits adhärennten Neutrophilen Granulozyten für 3 Minuten mit 10 μ M PG-E₁ beschichtet. Anschließend Fixierung und Anfärbung unterschied sich nicht von den Objektträgern, die nicht mit PG-E₁ beschichtet wurden. So konnte eine VASP-Phosphorylierung an Serin-157 und an Serin-239 nur nach Adhärenz der Neutrophilen Granulozyten und nach anschließender Stimulation mit Vasodilatoren verglichen werden. Dabei stellte sich die Frage, ob der Grad der Phosphorylierung und die intrazelluläre Verteilung des Phospho-VASP nach Stimulation mit PG-E₁ anders waren.

Zwischen der Versuchsreihe mit einer PG-E₁-Stimulation und ohne diese ließen sich jedoch keine wesentlichen Unterschiede in Bezug auf die Menge des Serin-157-Phospho-VASP und des Serin-239-Phospho-VASP und intrazelluläre Phospho-VASP-Verteilung feststellen.

Einige Plättchen mit Neutrophilen Granulozyten wurden nur mit sekundärem Antikörper angefärbt und dienten zur negativen Kontrolle.

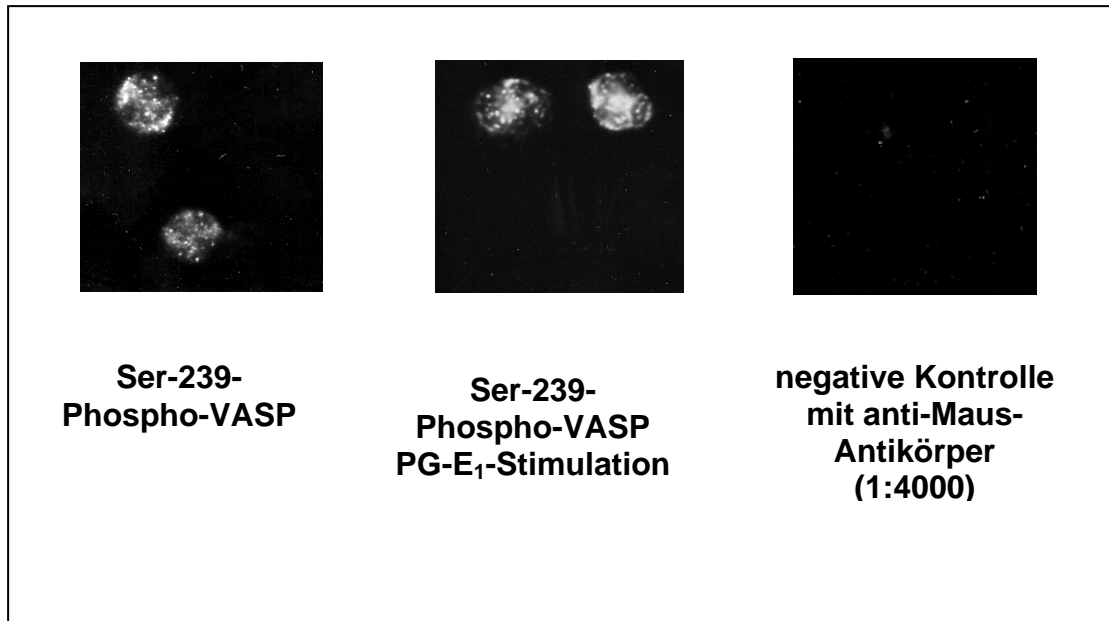


Abbildung 5.2.1

Immunfluoreszenz zum Nachweis des Serin-239-Phospho-VASP in adhärirten Neutrophilen Granulozyten.

Neutrophile Granulozyten wurden auf die mit humanem Serum des gleichen Spenders beschichteten Objektträger aufgetragen. Nach 10 Minuten wurde der Überstand entfernt und die adhärirten Neutrophilen Granulozyten auf den Objektträgern fixiert. Bei dem links dargestellten Experiment erfolgte keine zusätzliche Stimulation mit einem der Vasodilatoren. Bei dem Experiment, dessen Ergebnis in der Mitte dargestellt ist, erfolgte vor der Fixierung eine zusätzliche 3-minütige Inkubation mit 10 μ M PG-E₁. Zum Nachweis des Serin-239-Phospho-VASP wurde Antikörper 16C2 in einer Konzentration von 2 μ g/ml verwendet. Als Sekundärantikörper diente anti-Maus-Antikörper in einer Konzentration 1:4000. Auf der Abbildung rechts ist eine negative Kontrolle des Serin-239-Phospho-VASP dargestellt. Hier erfolgte die Anfärbung nur mit dem Sekundärantikörper in einer Konzentration von 1:4000.

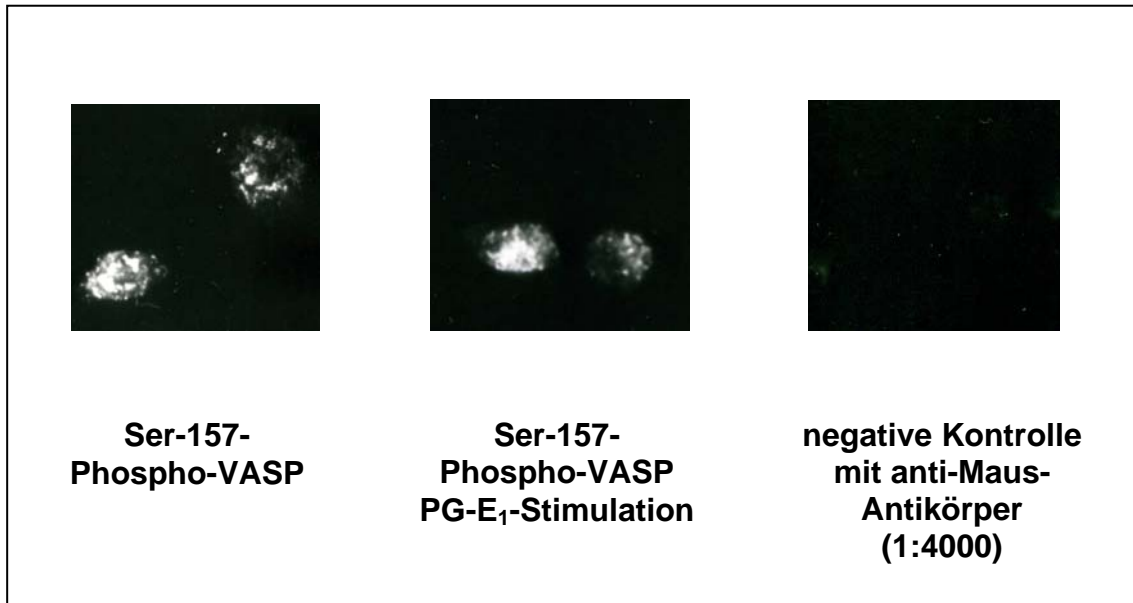


Abbildung 5.2.2

Immunfluoreszenz zum Nachweis des Serin-157-Phospho-VASP in adhärennten Neutrophilen Granulozyten.

Neutrophile Granulozyten wurden auf die mit humanem Serum des gleichen Spenders beschichteten Objektträger aufgetragen. Nach 10 Minuten wurde der Überstand entfernt und die adhärennten Neutrophilen Granulozyten auf den Objektträgern fixiert. Bei dem links dargestellten Experiment erfolgte keine zusätzliche Stimulation mit einem der Vasodilatoren. Bei dem Experiment, dessen Ergebnis in der Mitte dargestellt ist, erfolgte vor der Fixierung eine zusätzliche 3-minütige Inkubation mit 10 μ M PG-E₁. Zum Nachweis des Serin-157-Phospho-VASP wurde Antikörper 5C6 in einer Konzentration von 1 μ g/ml verwendet. Als Sekundärantikörper diente anti-Maus-Antikörper in einer Konzentration von 1:4000. Auf der Abbildung rechts ist eine negative Kontrolle des Serin-157-Phospho-VASP dargestellt. Hier erfolgte die Anfärbung nur mit dem Sekundärantikörper in einer Konzentration von 1:4000.

Fazit: Adhärenz der Neutrophilen Granulozyten an die Objektträger führt zur VASP-Phosphorylierung an Serin-157 und an Serin-239.

5.3 Aktivierung und Hemmung der p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1), der p38 MAPK sowie der Proteinkinase B (PKB) in humanen Neutrophilen Granulozyten

5.3.1 Aktivierung der p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1), der p38 MAPK und der Proteinkinase B (PKB) in humanen Neutrophilen Granulozyten

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) gehören zu einer Gruppe von zytoplasmatischen Proteinen, die als Bausteine einer zentralen Transduktionskaskade in eukaryontischen Zellen fungieren. Sie sind für die Überführung der äußeren Signale in die intrazellulären Signale verantwortlich (Seger und Krebs, 1995). Vertreter der MAPK-Gruppe sind in Hefe, in der *Drosophila melanogaster* und in den Zellen der Säugetiere entdeckt und beschrieben worden (Blumer and Johnson, 1994).

MAPK fungieren als Signalübermittler von Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Hormonen. Sie leiten die Proliferation und Differenzierung der Zelle ein. Weiterhin sind MAPK als Übermittler der mitogenen Wachstumssignale von vielen, wenn nicht allen extranuklearen Onkogenen beschrieben worden. Auch Phorbol-Ester, Ionophore und Hitze-Schockproteine benutzen die MAPK-Kaskade zur Signalübermittlung (Seger und Krebs, 1995).

MAPK phosphorylieren ihre Substrate an Serin und an Threonin, die an Prolinreste angrenzen, und werden deshalb auch als prolinabhängige Proteinkinasen bezeichnet. Viele MAPK werden durch gleiche Agonisten aktiviert, haben also eine „überlappende“ Spezifität (Kyriakis, 1994; Cano and Mahadevan, 1995). MAPK1 (p44 MAPK=ERK1) und MAPK2 (p42 MAPK=ERK2) zeigen ein starkes Ansprechen auf die Signale der Wachstumsfaktoren, aber nur ein schwaches auf Stressfaktoren wie osmotischer Schok, Hitzeschock und UV-Licht. Andere MAPK, dazu gehört auch p38 MAPK, sprechen am stärksten auf Stressfaktoren an (Robinson and Cobb, 1997). Deshalb werden sie auch als SAPK (*stress-activated protein kinase*)

bezeichnet. Fast alle SAPK werden auch durch proinflammatorische Zytokine aktiviert. SAPK5/ERK5 kann dagegen nur durch oxidativen und osmotischen Stress aktiviert werden (Cohen, 1997).

Mehrere zytoplasmatische Proteine sind als Substrate der p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1) nachgewiesen worden. Dazu gehören S6-Kinase p90^{rsk}, die an proliferativen Prozessen der Zellen beteiligt ist, und zytosolische Phospholipase A₂ (PLA₂), die die Arachidonsäurefreisetzung katalysiert und damit an der Biosynthese von Eikosaniden (z.B. Prostaglandinen und Leukotrienen) beteiligt ist. Ebenfalls dazu gehört eine Region des EDGF-Rezeptors, dessen Phosphorylierung durch p42/p44 MAPK zur Senkung seiner katalytischen Aktivität führt (Lin et al., 1993; Seger und Krebs, 1995; Widmann et al., 1999). Diese negative Rückkopplung in der Aktivierungskaskade von p42/p44 MAPK scheint eine Überstimulation der Zellen zu verhindern. Mehrere mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAP) wie MAP-1, MAP-2, MAP-4 und Tau sind ebenfalls als Substrate von p42/p44 MAPK nachgewiesen worden (Seger und Krebs, 1995; Widmann et al., 1999). Zusätzlich zur Phosphorylierung der zytoplasmatischen Proteine sind p42/p44 MAPK auch an der Phosphorylierung von mehreren Transkriptionsfaktoren im Zellkern beteiligt. Zu den Transkriptionsfaktoren, die durch p42/p44 MAPK phosphoryliert werden, gehören Elk1, c-Myc, Tal und andere (Lenormand et al., 1993; Widmann et al., 1999).

P38 MAPK wird unter dem Einfluss von zellulären Stressfaktoren phosphoryliert und damit aktiviert. Zu diesen Faktoren gehören UV-Strahlung, osmotischer Schock und Lipopolysaccharide (LPS), die in Bakterienwänden vorhanden sind (Cobb and Goldsmith, 1995; Robinson and Cobb, 1997; Cano and Mahadevan, 1995). MAPKAP (MAPK-aktivierte Proteinkinase 2 und 3), die das kleine 27 kDa-schwere Hitze-Schock-Protein (Hsp27) phosphorylieren (Rouse et al., 1994) sowie mehrere Transkriptionsfaktoren gehören zu den Substraten der p38 MAPK. Hsp 27 scheint für die Inhibierung der Apoptose in Neutrophilen Granulozyten verantwortlich zu sein (Sheth et al., 2001).

P42/p44 MAPK und p38 MAPK spielen eine entscheidende Rolle bei der Reaktion der Neutrophilen Granulozyten auf inflammatorische Stimuli (Torres et al., 1993) und

bei den damit verbundenen biochemischen Vorgängen. Dazu gehören z.B. die Produktion von freien Sauerstoffradikalen durch Neutrophile Granulozyten, Adhäsion und Exozytose der exkretorischen Granula. So hemmt SB203580, ein Inhibitor der p38 MAPK, die fMLP-induzierte Chemotaxis und TNF- α -induzierte Produktion von freien Sauerstoffradikalen durch diese Zellen. LPS-induzierte Freisetzung von TNF- α durch Neutrophile Granulozyten konnte ebenfalls unter Einwirkung des p38 MAPK-Inhibitors vollständig unterdrückt werden (Burg and Pillinger, 2001). p42/p44 MAPK regulieren entweder direkt oder indirekt die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von p47-Phagozytenoxidase (p47^{phox}), einer Komponente der NADPH-Oxidase, die für die Produktion der Superoxide durch Neutrophile Granulozyten unersetzlich ist (Park et al., 1997). Außerdem ist die Notwendigkeit der p42/p44 MAPK-Aktivierung für die Aggregation von Neutrophilen Granulozyten unter dem Einfluss von fMLP, C5a und IL-8 nachgewiesen worden (Grinstein and Furuya, 1992; Tores et al., 1993). All diese Prozesse sind für die Funktion der Neutrophilen Granulozyten als Abwehrzellen verantwortlich.

Aktivierung von p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1) wird durch Phosphorylierung einer Sequenz mit zweifachem Phosphorylierungsmotiv ausgelöst. In einer menschlichen Zelle entspricht diese Sequenz dem Threonin und Tyrosin in Positionen 202 und 204. Für die Aktivierung von MAPK ist eine gleichzeitige Phosphorylierung an beiden Stellen erforderlich (Rossomando et al., 1989). Die üblichen im Handel verkäuflichen Antikörper binden nur an die zweifach phosphorylierte Form von p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1) und detektieren deshalb nur die aktivierte Form von diesen MAPK. Für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente wurde ein monoklonaler Antikörper gegen die aktivierte Form von p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1) verwendet.

Die p38 MAPK besitzt ebenfalls zwei Phosphorylierungsstellen, deren gleichzeitige Phosphorylierung eine Voraussetzung für die Aktivierung dieser Kinase darstellt. In menschlichen Zellen ist die Phosphorylierung am Threonin in Position 180 und Tyrosin in Position 182 für die Aktivierung der p38 MAPK verantwortlich. Für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente wurde ein polyklonaler Antikörper gegen die aktivierte Form von p38 MAPK eingesetzt.

Proteinkinase B (PKB) wird in der Literatur auch als Akt bezeichnet. Sie stellt das zelluläre Homologon eines Retrovirus dar, der ursprünglich aus Tumorgewebe isoliert werden konnte und die Bezeichnung Akt 8 erhielt (Bellacosa et al., 1991; Coffey and Woodgett, 1991). PKB ist ein Substrat der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), die eine zentrale Rolle in biochemischen Vorgängen der Zelle spielt. Sie ist eine Lipidkinase, welche die Hydroxylgruppe an Position 3 des Inositorringes der Membranphosphatidylinositole phosphoryliert. Es entstehen dabei $\text{PI}(3)\text{P}$, $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ und $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$. $\text{PI}(3)\text{P}$ ist in allen eukaryontischen Zellen vorhanden. Die Konzentration an intrazellulärem $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ und $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ steigen erst nach Stimulation der Zelle mit unterschiedlichen Liganden. Die Aktivierung der PI3K ist entweder durch G-Protein, oder durch eine Rezeptortyrosinkinase (RTK) reguliert, je nach Subtyp der PI3K. Die PI3K stimuliert die PKB/Akt entweder direkt oder über die zwischengeschalteten PKB/Akt-Kinasen, so z.B. „*PI(3,4,5)P₃-dependent kinase 1*“ (PDK-1) oder „*PI(3,4,5)P₃-dependent kinase 2*“ (PDK-2) (Murga et al., 1998; Coffey et al., 1998; Leever et al., 1999).

In vielzelligen Organismen muss die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose streng reguliert werden, um einen funktionsfähigen Organismus aufrechtzuerhalten. Diese Aufgabe wird unter anderem von PKB übernommen. Sie ist in vielen Zellen ein Schlüsselenzym für Zellproliferation und Antiapoptose (Coffey et al., 1998; Datta et al., 1997; Dudek et al., 1997). Zu den Substraten der PKB gehören Proteine, die an der Regulation der Apoptose beteiligt sind. Als Beispiel können hier *Bad*, ein Mitglied der bcl-2 Familie sowie *FKHR* („*forhead in rhabdomyosarkoma*“), ein Transkriptionsfaktor, genannt werden. Phosphorylierung von *Bad* und *FKHR* durch aktivierte PKB verhindert, dass Prozesse der Apoptose in Gang gesetzt werden (Brownawell et al., 2001; Brunet et al., 1999). *PTEN* („*phosphatase and tention homologue detected on chromosome ten*“) ist eine Phospholipidphosphatase und scheint als ein negativer Regulator der PI3K/PKB-Kaskade und damit als Tumor-Suppressor-Gen zu fungieren. Seine mutierte Variante ist in mehreren humanen Tumorzellen entdeckt worden (Cantley und Neel, 1999).

Auch in Neutrophilen Granulozyten scheint PKB eine wichtige Rolle bei der Hemmung der Apoptose zu spielen (Webb et al., 2000). So lösen z.B. GM-CSF und

G-CSF, die die Apoptose der Neutrophilen Granulozyten hemmen, sowie Interferon eine PI3K-Aktivierung aus (Hiraguri et al, 1997). Jedoch bleibt die Rolle der PKB bei der Hemmung der Neutrophilenapoptose noch relativ wenig untersucht. Besser bekannt ist die Rolle der PKB in den Neutrophilen Granulozyten bei der Aktivierung von diesen Zellen. So scheint PKB eine entscheidende Rolle bei solchen Prozessen wie Phagozytose und Oxidativer Stress zu spielen (Tilton, 1997; Thelen, 1995).

Eine Phosphorylierung der spezifischen Aminosäurereste der PKB führt zu einer Aufhebung der intramolekularen Hemmung und zur Aktivierung dieser Kinase. Threonin-308 sowie Serin-473 sind die für die Aktivierung der PKB zuständigen Aminosäuren. Beide sind im Bereich des C-terminalen Endes angeordnet (Alessi et al., 1996). In vorliegender Arbeit dargestellte Experimente wurden mit anti-Phospho-Akt-Antikörper durchgeführt, der nur die aktive PKB-Form detektiert.

fMLP (N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin) ist ein synthetisch hergestelltes und am besten untersuchtes Formyl-Peptid. Formyl-Peptide stammen von Proteinen der Bakterien oder zerstörten Zellen ab. fMLP löst in Neutrophilen Granulozyten unterschiedliche biochemische Vorgänge aus, die für Adhäsion, Chemotaxis, Exkretion der sekretorischen Granula und Superoxidproduktion verantwortlich sind. All diese Vorgänge sind an der Abwehr gegen bakterielle Infektion durch Neutrophile Granulozyten verantwortlich (Dalpiaz et al., 2003).

In vorliegender Arbeit dargestellte Experimente dienten zum Nachweis der fMLP-induzierten Aktivierung der p42/p44 MAPK, der p38 MAPK sowie der PKB mittels der Western Blot-Technik.

Neutrophile Granulozyten wurden mit 10 nM fMLP stimuliert. Vor der Stimulation sowie auch nach 0.5, 1, 3 und 5 Minuten wurden Aliquots entnommen und der Grad der Aktivierung mit Hilfe der spezifischen Antikörper gegen phosphorylierte Formen von p42/44 MAPK, p38 MAPK und PKB bestimmt.

fMLP zeigte eine signifikante Aktivierung der p42/44 MAPK, p38 MAPK und PKB in humanen Neutrophilen Granulozyten (siehe Abbildungen 5.3.1, 5.3.4 und 5.3.7). Den

Abbildungen ist auch zu entnehmen, dass die Aktivierung der p42/p44 MAPK, der p38 MAPK und der PKB unter dem Einfluss von fMLP reversibel war. Die Anfärbung der Blots mit phosphorylierungsunabhängigen Antikörpern diente dem Proteinnachweis, zeigte also, dass in allen Banden etwa die gleiche Menge der entsprechenden Proteinkinase vorhanden war.

5.3.2 Hemmung der p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1), der p38 MAPK und der PKB durch Vasodilatoren in humanen Neutrophilen Granulozyten

Es existieren bereits mehrere Arbeiten, die den Einfluss der zyklischen Nucleotide cAMP und cGMP auf die Aktivierung von MAPK beschreiben. Je nach Zellart ist ein hemmender oder aktivierender Effekt beschrieben worden (siehe dazu auch Kapitel 6 „Diskussion“). Untersuchungen zum Einfluss von cAMP und cGMP auf die Aktivierung der MAPK in Neutrophilen Granulozyten blieben jedoch noch aus. Auch die PKB-Aktivierung unter dem Einfluss dieser Nucleotide ist bis jetzt noch nicht untersucht worden.

Folgende Experimente untersuchen den Einfluss von PG-E₁, Flolan und SNP auf die fMLP-induzierte Aktivierung der p42/p44 MAPK, der p38 MAPK und der PKB. Um die Wirkung der Vasodilatoren auf die MAPK- sowie die PKB-Phosphorylierung zu messen, wurden intakte humane Neutrophile Granulozyten für jeweils 3 Minuten mit 10 µM Flolan oder mit 10 µM PG-E₁ oder mit 100 µM SNP präinkubiert und dann mit fMLP gleicher Konzentration, wie ohne Präinkubation mit diesen Substanzen, stimuliert.

Vor der Stimulation sowie auch nach 0.5, 1, 3 und 5 Minuten wurden Aliquots entnommen und der Grad der Aktivierung von p42/p44 MAPK, von p38 MAPK und von PKB bestimmt.

Die Western Blots wurden quantitativ mit Hilfe des Programms NIH Image ausgewertet. So konnte der Schwärzungsgrad einzelner Banden in eingescannten Blots bestimmt werden. Dieser Schwärzungsgrad steht daher im direkten Verhältnis

zu der Menge des zu detektierenden Proteins, in diesem Fall zu der Menge von Phospho-p42/p44 MAPK, Phospho-p38 MAPK oder Phospho-PKB.

Bei der Ergebnisauswertung wurde der Phosphorylierungsgrad der untersuchten Kinasen nach 3-minütiger Stimulation mit 10 nM fMLP ohne Präinkubation mit einem der Vasodilatoren willkürlich gleich 100% gesetzt. Alle anderen Werte, so z.B. der Phosphorylierungsgrad nach 0,5, 1 und 5 Minuten sind in Experimenten nach Präinkubation mit Vasodilatoren und ohne diese in Relation zu diesem Wert gesetzt. Dieses Verfahren ermöglichte die Vergleichbarkeit der in verschiedenen Experimenten gewonnenen Data.

a) Einfluss der Präinkubation mit Vasodilatoren auf die Phosphorylierung der p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1) unter der Einwirkung von 10 nM FMLP

Abbildung 5.3.1 zeigt das Western Blot eines repräsentativen Experimentes, der den Einfluss der Präinkubation mit 10 μ M Flolan auf die Phosphorylierung und damit auf die Aktivierung der p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1) unter der Einwirkung von 10 nM fMLP untersucht. Dieser Abbildung ist zu entnehmen, dass eine Präinkubation mit 10 μ M Flolan einen hemmenden Effekt auf die Phosphorylierung von p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1) unter dem Einfluss von 10 nM fMLP hat. Kontrollfärbungen mit phosphorylierungsunabhängigen Antikörpern (siehe Abbildung 5.3.3) dienen zum Nachweis der gleichen Proteinmenge in allen Banden.

Abbildung 5.3.2 stellt den Einfluss der untersuchten Vasodilatoren auf die fMLP-induzierte Aktivierung von p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1) dar. Dieser Abbildung ist zu entnehmen, dass eine Präinkubation mit 100 μ M SNP oder mit 10 μ M PG-E₁ keinen signifikanten Effekt auf die fMLP-induzierte Phosphorylierung und damit auf die Aktivierung von p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1) hat.

Western Blots zum Nachweis des Einflusses von 10 μM PG-E₁ sowie von 100 μM SNP auf die fMLP-induzierte Phosphorylierung von p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1) sind hier nicht gezeigt.

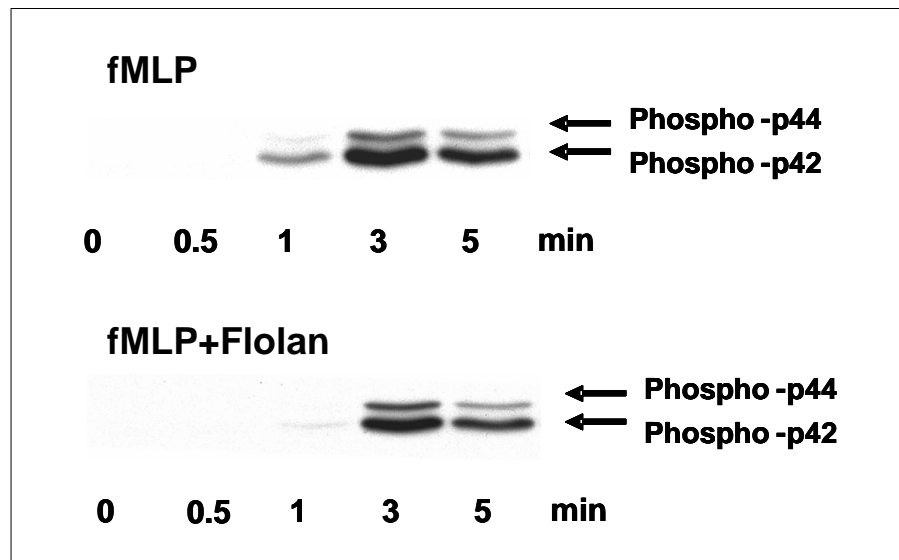


Abbildung 5.3.1

Einfluss von Flolan auf die p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1)-Phosphorylierung unter der Einwirkung von 10 nM fMLP. Isolierte Neutrophile Granulozyten wurden mit 10 nM fMLP stimuliert. Vor der Stimulation sowie nach 0.5, 1, 3 und 5 Minuten wurden Aliquots entnommen und die Stimulierungsreaktion mit gleicher Menge SDS-Stoplösung unterbrochen. Zum Vergleich ist derselbe Versuch nach einer 3-minütiger Präinkubation mit 10 μM Flolan durchgeführt worden. Die Phosphorylierung von p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1) wurde mit Hilfe des anti-Phospho-Erk1/Erk2-Antikörpers mittels der Western Blot- Technik nachgewiesen. Dieser Abbildung ist zu entnehmen, dass Präinkubation mit 10 μM Flolan einen hemmenden Einfluss auf die fMLP-induzierte Aktivierung von p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1) hat. Die dargestellten Blots sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente.

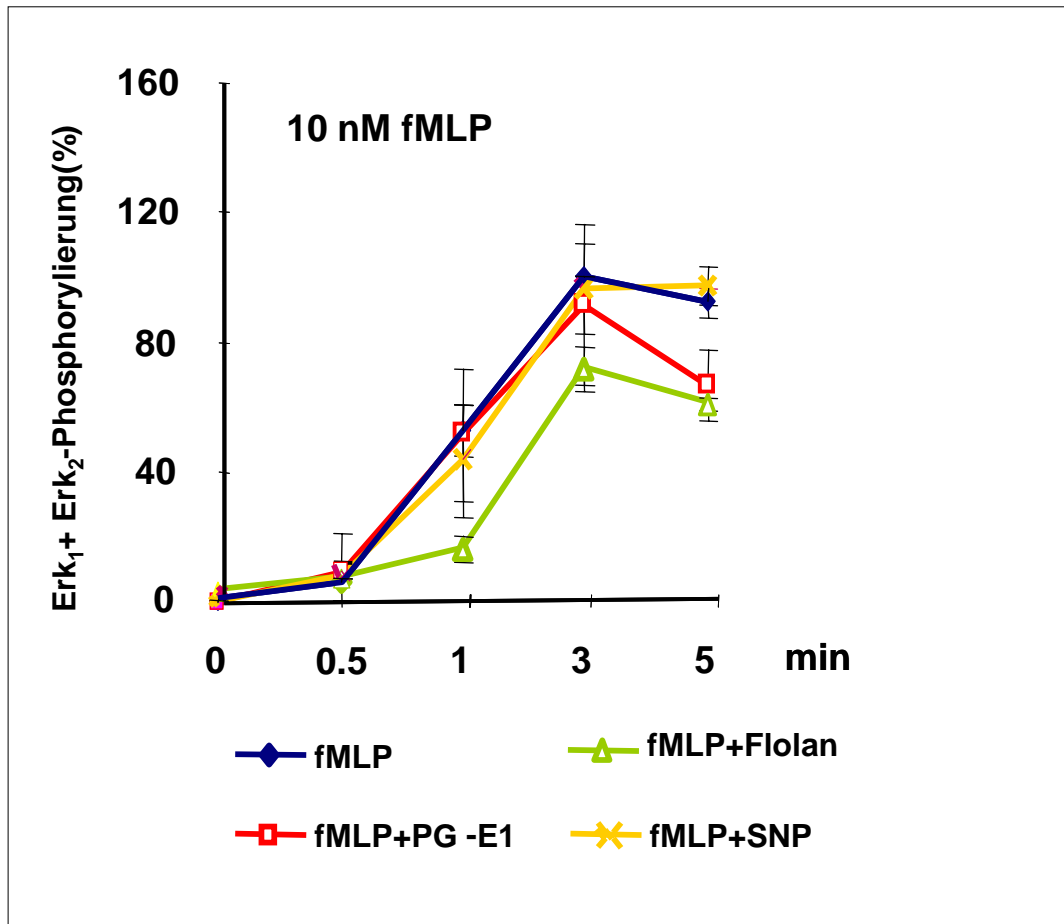


Abbildung 5.3.2

Quantitative Analyse des Einflusses von Flolan, PG-E₁ und SNP auf die p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1)-Phosphorylierung unter der Einwirkung von 10 nM fMLP.

Die Diagramme fassen drei voneinander unabhängige Experimente zusammen. Dargestellt ist die Rate der p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1)-Phosphorylierung unter der Einwirkung von 10 nM fMLP ohne Präinkubation mit einem der Vasodilatoren, nach Präinkubation mit 10 µM Flolan oder mit 10 µM PG-E₁ oder mit 100 µM SNP. Als 100% wurde der p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1)-Phosphorylierungsgrad nach 3-minütiger Stimulation mit 10 nM fMLP festgelegt. Alle anderen Werte sind relativ zu diesem Wert angegeben. Dem Diagramm ist zu entnehmen, dass eine Präinkubation mit Flolan, jedoch nicht mit PG-E₁ oder SNP einen hemmenden Effekt auf die p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1)-Phosphorylierung hat.

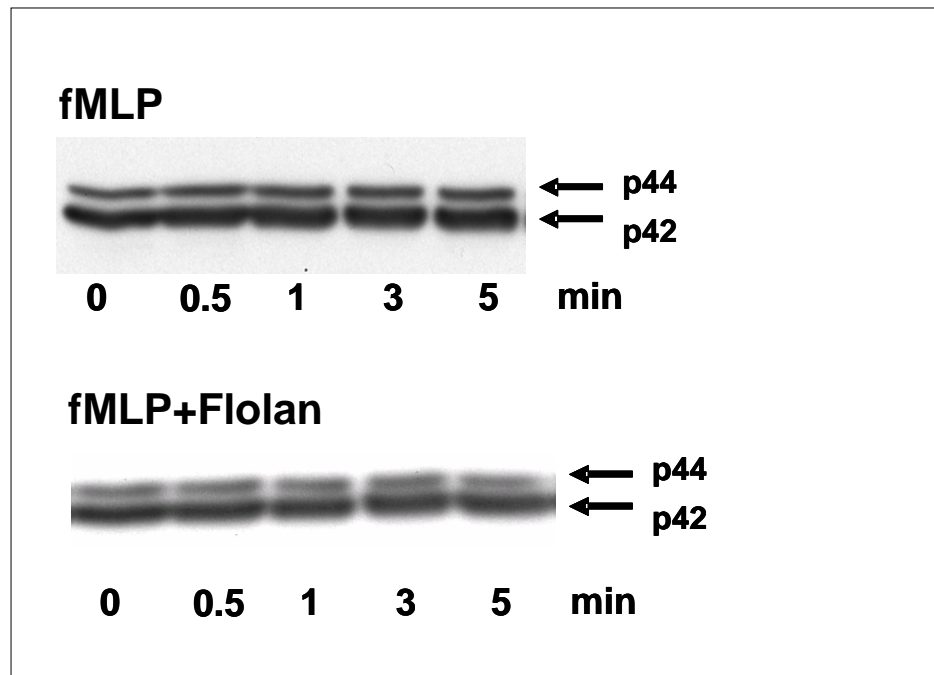


Abbildung 5.3.3

Proteinnachweis zu den in Abbildung 5.3.1 dargestellten Western Blots.

Beide Western Blots zeigen eine Anfärbung mit dem phosphorylierungsunabhängigen Antikörper gegen p42/p44 MAPK und weisen die gleiche Proteinmenge in allen Banden nach.

Fazit: Eine Präinkubation mit 10 μ M Flolan, jedoch nicht mit 10 μ M PG-E1 oder mit 100 μ M SNP hat einen hemmenden Einfluss auf die fMLP-induzierte Phosphorylierung und damit auf die Aktivierung der p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1).

b) Einfluss der Präinkubation mit Vasodilatoren auf die Phosphorylierung der p38 MAPK unter der Einwirkung von 10 nM fMLP

Abbildung 5.3.4 zeigt das Western Blot eines repräsentativen Experimentes, der den Einfluss der Präinkubation mit 10 μ M Flolan auf die Phosphorylierung und damit auf die Aktivierung der p38 MAPK unter der Einwirkung von 10 nM fMLP untersucht. Dieser Abbildung ist zu entnehmen, dass eine Präinkubation mit 10 μ M Flolan einen hemmenden Effekt auf die Phosphorylierung der p38 MAPK unter der Einwirkung von 10 nM fMLP hat. Kontrollfärbung mit phosphorylierungsunabhängigem Antikörper (siehe Abbildung 5.3.6) dient zum Nachweis der gleichen Proteinmenge in allen Banden.

Abbildung 5.3.5 stellt den Einfluss der Vasodilatoren auf die Aktivierung von p38 MAPK nach Stimulation mit 10 nM fMLP dar. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass 100 μ M SNP sowie auch 10 μ M PG-E1 keinen signifikanten Einfluss auf die fMLP-induzierte Phosphorylierung und damit auf die Aktivierung von p38 MAPK haben.

Western Blots zum Nachweis des Einflusses der Präinkubation mit 10 μ M PG-E₁ sowie mit 100 μ M SNP auf die fMLP-induzierte Phosphorylierung der p38 MAPK sind hier nicht gezeigt.

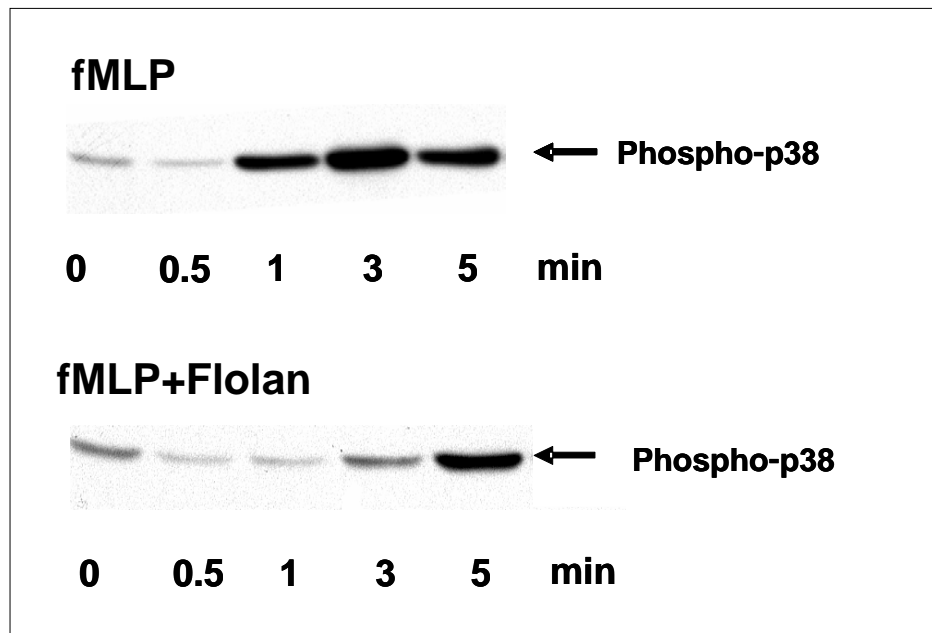


Abbildung 5.3.4

Einfluss von Flolan auf die Phosphorylierung der p38 MAPK unter der Einwirkung von 10 nM fMLP.

Isolierte Neutrophile Granulozyten wurden mit 10 nM fMLP stimuliert. Vor der Stimulation sowie nach 0.5, 1, 3 und 5 Minuten wurden Aliquots entnommen und die Stimulierungsreaktion mit gleicher Menge SDS-Stopplösung unterbrochen. Zum Vergleich ist derselbe Versuch nach einer 3-minütiger Präinkubation mit 10 μM Flolan durchgeführt worden.

Die Phosphorylierung von p38 MAPK wurde mit Hilfe des anti-Phospho-p38-Antikörpers mittels der Western Blot-Technik nachgewiesen. Dieser Abbildung ist zu entnehmen, dass Präinkubation mit 10 μM Flolan einen hemmenden Einfluss auf die Aktivierung von p38 MAPK unter der Einwirkung von 10 nM fMLP hat. Die dargestellten Blots sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente.

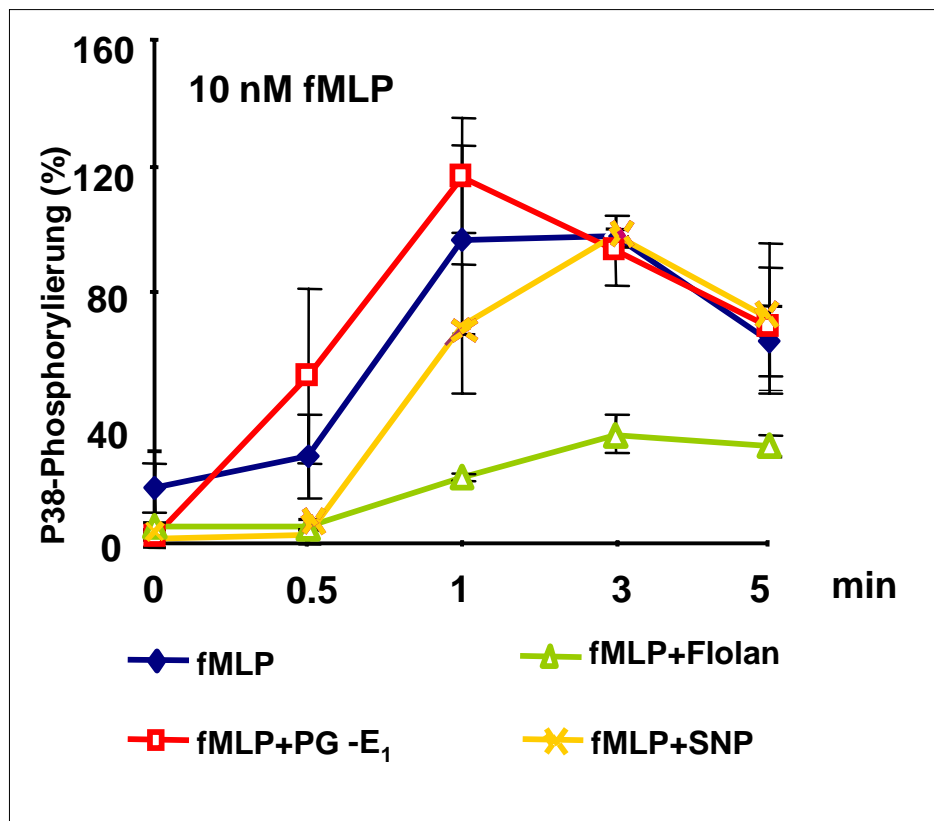


Abbildung 5.3.5

Quantitative Analyse des Einflusses von Flolan, PG-E₁ und SNP auf die Phosphorylierung der p38 MAPK unter der Einwirkung von 10 nM fMLP.

Die Diagramme fassen drei voneinander unabhängige Experimente zusammen. Dargestellt ist die Rate der Phosphorylierung der p38 MAPK unter der Einwirkung von 10 nM fMLP ohne Präinkubation mit einem der Vasodilatoren, nach Präinkubation mit 10 μ M Flolan oder mit 10 μ M PG-E₁ oder mit 100 μ M SNP. Als 100% wird der Phosphorylierungsgrad der p38 MAPK nach 3-minütiger Stimulation mit 10 nM fMLP festgelegt. Alle anderen Werte sind relativ zu diesem Wert angegeben. Dem Diagramm ist zu entnehmen, dass eine Präinkubation mit Flolan, jedoch nicht mit PG-E₁ oder SNP einen hemmenden Effekt auf die Phosphorylierung der p38 MAPK hat.

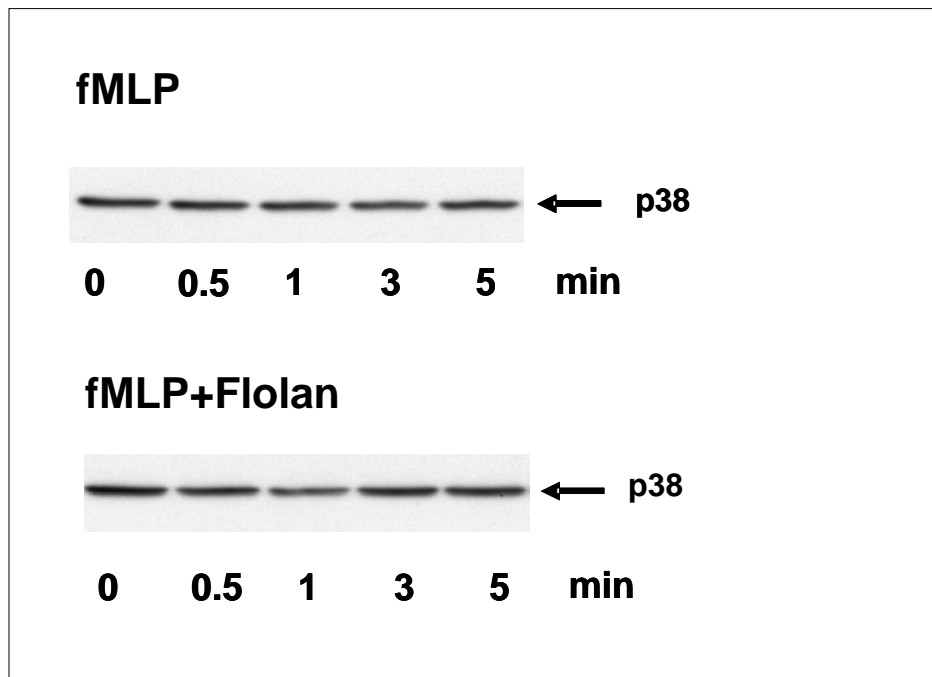


Abbildung 5.3.6

Proteinnachweis zu den in der Abbildung 5.3.4 dargestellten Western Blots.

Beide Western Blots zeigen eine Anfärbung mit dem phosphorylierungsunabhängigen Antikörper gegen p38 MAPK und weisen die gleiche Proteinmenge in allen Banden nach.

Fazit: Eine Präinkubation mit 10 μ M Flolan, jedoch nicht mit 10 μ M PG-E₁ oder mit 100 μ M SNP hat einen hemmenden Einfluss auf die fMLP-induzierte Phosphorylierung und damit auf die Aktivierung der p38 MAPK.

c) Einfluss der Präinkubation mit Vasodilatoren auf die PKB-Phosphorylierung unter der Einwirkung von 10 nM fMLP

5. ERGEBNISSE

Abbildung 5.3.7 zeigt das Western Blot eines repräsentativen Experimentes, der den Einfluss der Präinkubation mit 10 μM Flolan auf die Phosphorylierung und damit auf die Aktivierung der PKB unter der Einwirkung von 10 nM fMLP untersucht. Dieser Abbildung ist zu entnehmen, dass eine Präinkubation mit 10 μM Flolan einen hemmenden Effekt auf die Phosphorylierung von PKB unter der Einwirkung von 10nM fMLP hat. Kontrollfärbung mit phosphorylierungsunabhängigem Antikörper (siehe Abbildung 5.3.9) dient zum Nachweis der gleichen Proteinmenge in allen Banden.

Abbildung 5.3.8 stellt den Einfluss der Vasodilatoren auf die Aktivierung von PKB nach Stimulation mit 10 nM fMLP dar. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass 100 μM SNP sowie auch 10 μM PG-E₁ keinen signifikanten Einfluss auf die fMLP-induzierte Phosphorylierung und damit auf die Aktivierung von PKB haben.

Western Blots zum Einfluss von 10 μM PG-E₁ sowie von 100 μM SNP auf die fMLP-induzierte Phosphorylierung von PKB sind hier nicht gezeigt.

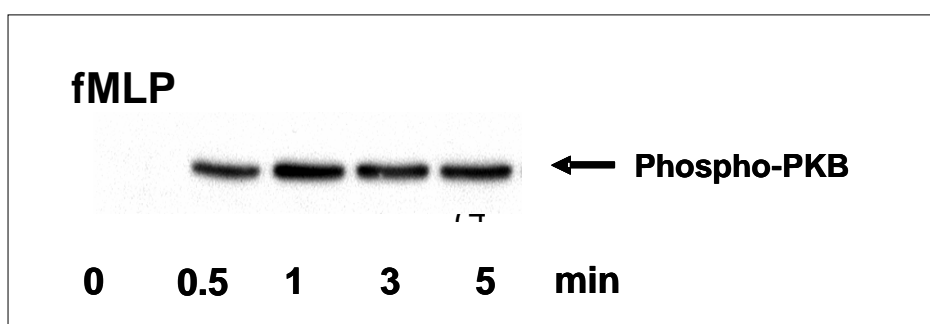


Abbildung 5.3.7

Einfluss von Flolan auf die PKB-Phosphorylierung unter der Einwirkung von 10 nM fMLP.

Isolierte Neutrophile Granulozyten wurden mit 10 nM fMLP stimuliert. Vor der Stimulation sowie nach 0.5, 1, 3 und 5 Minuten wurden Aliquots entnommen und die Stimulierungsreaktion mit gleicher Menge SDS-Stopplösung unterbrochen. Zum Vergleich ist derselbe Versuch nach einer 3-minütigen Präinkubation mit 10 μ M Flolan durchgeführt worden. Die Phosphorylierung der PKB wurde mit Hilfe des anti-Phospho-Akt-Antikörpers mittels der Western Blot-Technik nachgewiesen. Dieser Abbildung ist zu entnehmen, dass Präinkubation mit 10 μ M Flolan eine hemmende Wirkung auf die fMLP-unduzierte Aktivierung der PKB hat. Die dargestellten Blots sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente.

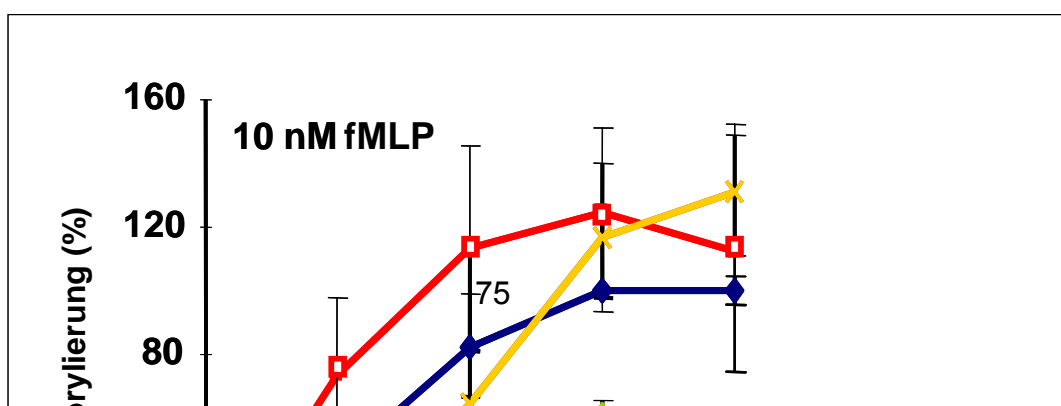


Abbildung 5.3.8

Quantitative Analyse des Einflusses von Flolan, PG-E₁ und SNP auf die PKB-Phosphorylierung unter der Einwirkung von 10 nM fMLP.

Die Diagramme fassen drei voneinander unabhängige Experimente zusammen. Dargestellt ist die Rate der PKB-Phosphorylierung unter der Einwirkung von 10 nM fMLP ohne Präinkubation mit einem der Vasodilatoren sowie nach Präinkubation mit 10 µM Flolan oder mit 10 µM PG-E₁ oder mit 100 µM SNP. Als 100% wurde der PKB-Phosphorylierungsgrad nach 3-minütiger Stimulation mit 10 nM fMLP festgelegt. Alle anderen Werte sind relativ zu diesem Wert angegeben. Dem Diagramm ist zu entnehmen, dass eine Präinkubation mit Flolan, jedoch nicht mit PG-E₁ oder SNP einen hemmenden Effekt auf die PKB-Phosphorylierung hat.

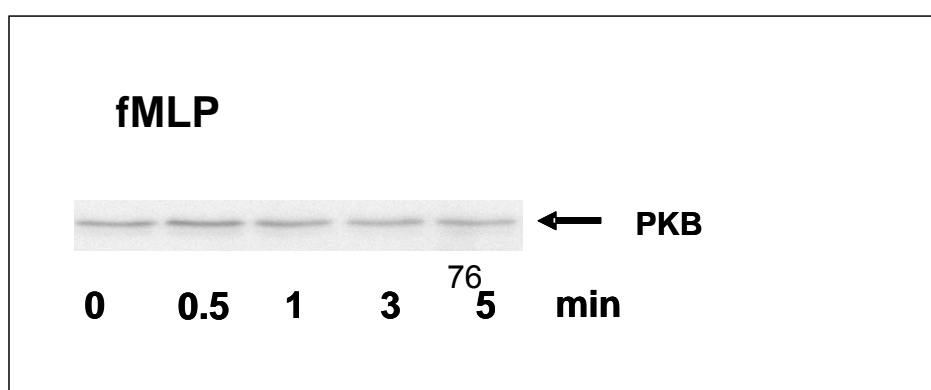


Abbildung 5.3.9

Proteinnachweis zu den in Abbildung 5.3.7 dargestellten Western Blots.

Beide Western Blots zeigen eine Färbung mit dem phosphorylierungsunabhängigen Antikörper gegen PKB und weisen die gleiche Proteinmenge in allen Banden nach.

Fazit: Eine Präinkubation mit 10 μ M Flolan, jedoch nicht mit 10 μ M PG-E₁ oder mit 100 μ M SNP hat einen hemmenden Einfluss auf die fMLP-induzierte Phosphorylierung und damit auf die Aktivierung von PKB.

d) Zusammenfassung der Experimente zum Einfluss der Vasodilatoren auf die fMLP-induzierte Phosphorylierung der p42/p44 MAPK, der p38 MAPK und der PKB

5. ERGEBNISSE

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Präinkubation mit 10 μM Flolan einen signifikanten hemmenden Einfluss auf die fMLP-induzierte Aktivierung der p42/p44 MAPK, der p38 MAPK und der PKB hat. Diese signifikante Hemmung zeigte sich bereits nach 0.5 Minuten der Stimulation. Der hemmende Effekt von 10 μM PG-E₁ und 100 μM SNP war in den beschriebenen Experimenten nicht signifikant.

Vasoaktive Substanz (3-minütige Präinkubation vor Stimulation mit fMLP)	Relative Rate von Phosphorylierung der p42/p44 MAPK in Bezug auf den 3-minuten Wert der Stimulation ohne Präinkubation mit einer der Vasoaktiven Substanzen (%).			
	nach 0.5 min	nach 1 min	nach 3 min	nach 5 min
ohne Präinkubation	5,8	52,6	100	92,2
Flolan 10 μM	6,9	15,9	71,2	60,9
PG-E ₁ 10 μM	9,2	51,5	91,8	66,6
SNP 100 μM	77	43,3	96,5	97,3

Tabelle A

Zusammengefasste Darstellung der relativen Raten der Phosphorylierung der p42/p44 MAPK in intakten humanen Neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit 10 nM fMLP. Dargestellt sind relative Raten von Phosphorylierung der p42/p44 MAPK nach 0.5, 1, 3 und 5 Minuten der Stimulation mit fMLP. Der Nachweis erfolgte mittels der Western Blot-Technik unter Verwendung des anti-Phospho-p42/p44-Antikörpers. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass 10 μM Flolan, jedoch nicht 10 μM PG-E₁ oder 100 μM SNP einen signifikanten hemmenden Einfluss auf die fMLP-induzierte Aktivierung der p42/44 MAPK zeigt.

Vasoaktive Substanz	Relative Rate von Phosphorylierung der p38 MAPK in Bezug auf den 3-minuten Wert der Stimulation ohne
---------------------	---

(3-minütige Präinkubation vor Stimulation mit fMLP)	Präinkubation mit einer der Vasoaktiven Substanzen (%).			
	nach 0.5 min	nach 1 min	nach 3 min	nach 5 min
ohne Präinkubation	29,7	98,9	100	66,9
Flolan 10 µM	8	23,3	36,9	33,7
PG-E ₁ 10 µM	55,5	119,2	95,6	70,7
SNP 100 µM	4,2	70,6	99,5	73,8

Tabelle B

Zusammengefasste Darstellung der relativen Raten von Phosphorylierung der p38 MAPK in intakten humanen Neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit 10 nM fMLP. Dargestellt sind relative Raten von Phosphorylierung der p38 MAPK nach 0.5, 1, 3 und 5 Minuten. Der Nachweis erfolgte mittels der Western Blot-Technik unter Verwendung des anti-Phospho-p38-Antikörpers. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass 10 µM Flolan, jedoch nicht 10 µM PG-E₁ oder 100 µM SNP einen signifikanten hemmenden Einfluss auf die fMLP-induzierte Aktivierung der p38 MAPK zeigt.

	Relative Rate von Phosphorylierung der PKB in
--	--

Vasoaktive Substanz (3-minütige Präinkubation vor Stimulation mit fMLP)	Bezug auf den 3-minuten Wert der Stimulation ohne Präinkubation mit einer der Vasoaktiven Substanzen (%)			
	nach 0.5 min	nach 1 min	nach 3 min	nach 5 min
ohne Präinkubation	44,7	82,1	100	99,3
Flolan 10 µM	8,6	27	59,9	52,3
PG-E ₁ 10 µM	72,2	112,8	124,5	111,5
SNP 100 µM	22,1	63,6	116,1	131,2

Tabelle C

Zusammengefasste Darstellung der relativen Raten von Phosphorylierung der PKB in intakten humanen Neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit 10 nM fMLP. Dargestellt sind relative Raten der PKB-Phosphorylierung nach 0.5, 1, 3 und 5 Minuten. Der Nachweis erfolgte mittels der Western Blot-Technik unter Verwendung des anti-Phospho-Akt-Antikörpers. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass 10 µM Flolan, jedoch nicht 10 µM PG-E₁ oder 100 µM SNP einen signifikanten hemmenden Einfluss auf die fMLP-induzierte Aktivierung der PKB zeigt.

6. Diskussion

6.1 VASP- Phosphorylierung in humanen Neutrophilen Granulozyten

a) VASP-Phosphorylierung nach Stimulation mit Vasodilatoren

Wie im Kapitel „Einleitung“ dargestellt, sind Untersuchungen zu aktivierenden und hemmenden Effekten auf molekularer Ebene für das Verständnis der Funktion von Neutrophilen Granulozyten unentbehrlich. Zu hemmenden Substanzen von Neutrophilen Granulozyten gehören auch cAMP- und wahrscheinlich auch cGMP-erhöhende Substanzen, wie die von Endothelzellen sezernierten Faktoren PG-I₂ und EDRF (NO) oder die pharmakologisch hergestellten Vasodilatoren PG-E₁ und SNP. Die cAMP-erhöhende Substanzen hemmen sowohl die Freisetzung der zytotoxischen Enzyme und Produktion der Sauerstoffradikale als auch Chemotaxis (Hecker et al, 1990; Quilliam et al., 1991; Cronstein et al., 1991). Die cGMP-erhöhende Substanzen können die Enzymfreisetzung sowohl bewirken wie auch hemmen (Wenzel-Seifert et al., 1991; Darius et al., 1992). Das gleiche gilt für die Migration der Neutrophilen Granulozyten (Elferink and VanUffelen, 1996). Intrazelluläre Erhöhung der cAMP- oder cGMP-Konzentrationen führen zur Aktivierung der cAMP-PK (PKA) und cGMP-PK (PKG), die ihrerseits zur Phosphorylierung zahlreicher Zielmoleküle führen. Zu diesen Zielmolekülen gehört auch das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein VASP (Eigenthaler et al., 1992; Walter et al., 1993).

Die vorliegende Arbeit setzte es sich zum Ziel, die VASP-Phosphorylierung an den Phosphorylierungsstellen Serin-157 und Serin-239 und die Kinetik dieser Phosphorylierung in humanen Neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit Vasoaktiven Substanzen zu untersuchen. Diese Untersuchungen wurden mittels der Western Blot-Technik unter Verwendung spezifischer monoklonalen Antikörper gegen Serin-157 und Serin-239 durchgeführt. Durch quantitative Western Blot-Analyse konnte in humanen Neutrophilen Granulozyten eine reversible Phosphorylierung an beiden Phosphorylierungsstellen nach Einwirkung von PG-E₁

und Flolan festgestellt werden. Ergebnisse dieser Versuche sind in den Tabellen 5.1.1 und 5.1.2 (Kapitel 5) zusammengefasst. In Bezug auf die VASP-Phosphorylierung an Serin-157 und an Serin-239 zeigte PG-E₁ eine stärkere Wirkung im Vergleich mit Flolan.

Für humane Neutrophile Granulozyten gilt:

PG-E₁ wirkt stärker als Flolan

Dieses Ergebnis lässt sich gut mit früheren Untersuchungen von E. Klippel in Einklang bringen (Klippel, 1997). Der Autor dieser Arbeit ist ebenfalls zu dem Ergebnis gekommen, dass PG-E₁ stärkere Auswirkung auf die VASP-Phosphorylierung im Vergleich mit Flolan hat. Seine Versuche erfolgten im Unterschied zu in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimenten mit Hilfe eines polyklonalen anti-VASP-Antikörpers (M4) und konnten deswegen nur die Phosphorylierung von Serin-157 unter Auswertung des VASP-„Shiftes“ nachweisen. Wie im vorherigen Kapitel erwähnt, bewirkt die Phosphorylierung des Serin-157 eine Änderung des Laufverhaltens von VASP bei der Elektrophorese. Im Gegensatz zu Neutrophilen Granulozyten wirken die Prostaglandine in umgekehrter Stärke auf die VASP-Phosphorylierung in humanen Thrombozyten. So ist eine stärkere Wirkung von Flolan im Vergleich mit PG-E₁ in Thrombozyten beschrieben worden (Butt et al., 1994).

Für humane Thrombozyten gilt:

Flolan wirkt stärker als PG-E₁

Die unterschiedliche Stärke der Auswirkung der beiden Substanzen auf VASP-Phosphorylierung in unterschiedlichen Zellarten kann durch folgende Überlegungen erklärt werden:

PG-E₁ und Flolan binden an verschiedenen, nur für diese Substanzen spezifischen Rezeptoren. PG-E₁ gehört zu Prostaglandinen der E-Reihe und bindet an einer Untergruppe der Rezeptoren dieser Reihe, und zwar an dem spezifischen EP4 Rezeptor. Flolan gehört zu Prostazyklinen und bindet an dem spezifischen Prostazyklinrezeptor (IP) (Breyer et al, 2001). Neutrophile Granulozyten und

Thrombozyten können die RP4 und IP Rezeptoren im unterschiedlichen Maße auf ihrer Oberfläche exprimieren. Stärke der VASP-Phosphorylierung kann dann im direkten Verhältnis mit der Anzahl der auf der Zelloberfläche exprimierten Rezeptoren für PG-E₁ und Flolan stehen.

Ausserdem kann die Affinität der RP4 und IP-Rezeptoren in humanen Thrombozyten und Neutrophilen Granulozyten unterschiedlich ausgeprägt sein.

Es muß auch erwähnt werden, dass die Spezifität des synthetischen PG-E₁ in Bezug auf die Bindung an seinen Rezeptoren in der Literatur angezweifelt wird. So ist eine Bindung von PG-E₁ nicht nur an den für diese Substanz spezifische RP4-Rezeptoren beschrieben worden, sondern auch an anderen Rezeptoren aus der E-Reihe. Dazu gehört z. B. der RP1-Rezeptor (Rezeptor für PG-E₂) (Hata und Breyer, 2004). Das würde bedeuten, dass die Wirkung von PG-E₁ einem Summationseffekt entspricht. Die VASP-Phosphorylierung ist dann auch von der auf der Oberfläche der Neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten exprimierten RP1-Rezeptoren abhängig. Es ist ohne Zweifel möglich, dass auch RP1-Rezeptoren auf der Oberfläche der beiden Zellgruppen unterschiedlich exprimiert werden.

In der vorliegenden Arbeit ist auch gezeigt worden, dass cGMP-erhöhende Substanzen wie SNP und cGMP-Analog (8-pCPT-cGMP) im Unterschied zu cAMP-erhöhenden Substanzen keine Phosphorylierung des Serin-239-VASP bewirken können. Phosphorylierung des Serin-157-VASP konnte jedoch auch mit cGMP-erhöhenden Substanzen nachgewiesen werden.

Für humane Neutrophile Granulozyten gilt folglich:

*cGMP-erhöhende Substanzen bewirken VASP-Phosphorylierung an Serin-157,
jedoch nicht an Serin-239*

Es ist schon seit langem bekannt, dass cAMP zur Aktivierung der PKA und cGMP zur Aktivierung von PKG führen. In Bezug auf die VASP-Phosphorylierung besitzen diese beiden Kinasen unterschiedliche Affinität zu den VASP-Phosphorylierungsstellen. So ist für PKG viel stärkere Affinität zu Serin-239 im

6. DISKUSSION

Vergleich mit PKA, und für PKA viel stärkere Affinität zu Serin-157 im Vergleich mit PKG nachgewiesen worden (Butt et al., 1994; Smolenski et al., 1998).

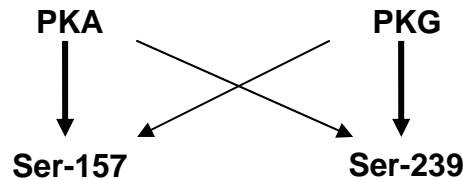


Abbildung 6.1.1 VASP-Phosphorylierung durch PKA und PKG (Butt et al., 1994).

Fehlende Phosphorylierung von Serin-239-VASP in humanen Neutrophilen Granulozyten unter Einwirkung der cGMP-erhöhenden Substanzen könnte deshalb auf eine fehlende oder zu schwache Wirkung der PKG in Neutrophilen Granulozyten hinweisen. Tatsächlich scheinen Neutrophile Granulozyten, wenn überhaupt, nur wenig PKG zu besitzen. So konnte PKG in Neutrophilen Granulozyten mittels Western Blot-Technik nicht nachgewiesen werden (Klippel, 1997). Versuche, die mit Hilfe der Immunfluoreszenz zum Nachweis der PKG in Neutrophilen Granulozyten durchgeführt worden sind, konnten jedoch eine diffuse Anfärbung des Zytoplasmas, des mikrotubulären Zentrums und des nuklearen Euchromatins darstellen (Pryzwanski et al., 1990, 1995). Auch die cGMP-Effekte auf die Aktivierung und Hemmung der Neutrophilen Granulozyten sind sehr widersprüchlich. Als Beispiel dafür kann der cGMP-Einfluss auf die Aktivierung und Hemmung der Neutrophilenmigration genannt werden. Die cGMP-vermittelte Aktivierung konnte bei einer ganz bestimmten Konzentration des intrazellulären cGMP nachgewiesen werden. Bei höheren cGMP-Konzentrationen verschwand dieser aktivierende Effekt und es konnte sogar eine Hemmung der Neutrophilenmigration festgestellt werden (Elferink und de Koster, 1993). Eine fehlende Phosphorylierung von Serin-239-VASP unter dem Einfluss der cGMP-erhöhenden Substanzen spricht dafür, dass die Effekte der PKG in Neutrophilen Granulozyten für eine solche Phosphorylierung nicht ausreichen.

Thrombozyten der Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen, wie z. B. chronische myeloische Leukämie, zeigen oft eine ähnliche Konstellation der intrazellulären PKA und PKG. So zeigen solche Zellen normale Mengen von PKA und VASP, die PKG-Menge ist jedoch, verglichen mit Thrombozyten gesunder Menschen, stark reduziert (Eigenthaler et al., 1993). Thrombozyten der Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen zeigten, verglichen mit Thrombozyten Gesunder, ein viel schwächeres Ansprechen auf cGMP-erhöhende Vasodilatoren in Bezug auf die VASP-Phosphorylierung. In dem erwähnten Artikel beschriebene Versuche wurden genauso wie in der Arbeit von Klippel mit dem polyklonalen anti-VASP-Antikörper durchgeführt und konnten deswegen nur die Phosphorylierung von Serin-157 beurteilen.

Wenn die Neutrophilen Granulozyten tatsächlich nur wenig PKG besitzen, stellt sich die Frage, wie die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Phosphorylierung an Serin-157 unter dem Einfluss von cGMP-erhöhenden Substanzen zustande kommt. Eine mögliche cGMP-vermittelte PKA-Aktivierung könnte eine Antwort auf diese Frage sein. Hinweise auf diese mögliche Aktivierung geben mehrere vor kurzem erschienene Studien. In diesen Studien konnte z. B. gezeigt werden, dass cGMP zur Aktivierung von PKA durch Hemmung der Phosphodiesterase 3 (PDE₃) führen kann (Li et al., 2003). Zwar besitzen die Neutrophile Granulozyten hauptsächlich Phosphodiesterase 4 (PDE₄), möglich kann ein ähnlicher Einfluss der cGMP auch auf diese Phosphodiesterase erwartet werden. PKA-abhängige intrazelluläre Effekte konnten auch in den glatten Gefäßmuskelzellen der PKG-defizienten Mäuse unter Einwirkung der cGMP ausgelöst werden. Auch die VASP-Phosphorylierung unter Einwirkung von cGMP-erhöhenden Substanzen konnte in PKG-defizienten Mäusen demonstriert werden (Sausbier et al., 2000).

Es gibt nicht nur Hinweise auf die Wechselwirkung zwischen cGMP und PKA. Viele Studien beschreiben auch eine Wechselwirkung zwischen cAMP und PKG. So kann z.B. cAMP zur Aktivierung von PKG in COS-7 Fibroblasten führen (Lin, 2001). Auch in glatten Gefäßmuskelzellen ist diese Wechselwirkung festgestellt worden (Lincoln et al., 1990; Jiang et al, 1992; Komalavilas und Lincoln, 1996; White et al, 2000).

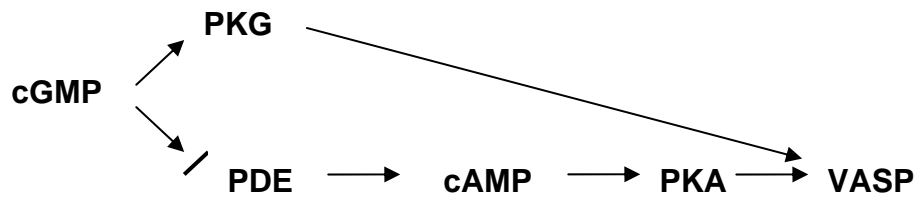


Abbildung 6.1.2 Möglicher Weg der VASP-Phosphorylierung unter der Einwirkung der cGMP-erhöhenden Substanzen.

Für Thrombozyten ist jedoch die Phosphorylierung an beiden Phosphorylierungsstellen unter Einwirkung von cGMP-erhöhenden Substanzen beschrieben worden (Smolenski, 1998). Das wäre bei dieser Zellart aber auch zu erwarten, da diese Zellen große Mengen an PKG besitzen (Eigenthaler et al., 1992).

b) VASP- Phosphorylierung nach Adhäsion der Neutrophilen Granulozyten

Adhäsion ist ein unentbehrlicher Prozess bei der Migration der Neutrophilen Granulozyten aus dem Blut in das entzündliche Gewebe und ist mit der Formänderung von Neutrophilen Granulozyten verbunden. Beteiligung von VASP und der VASP-Phosphorylierung bei der Neutrophilenadhärenz ist schon seit einigen Jahren bekannt. Bis jetzt existierten jedoch nur Arbeiten, die VASP-Phosphorylierung mit einem anti-VASP-Antikörper (M4) nach Auswertung des „Shifts“ im Western Blot in immunpräzipitierten Neutrophilen Granulozyten untersuchten. Deshalb waren nur Aussagen zu VASP-Phosphorylierung an Serin-157 in Neutrophilen Granulozyten möglich. Der Nachweis des phosphorylierten Serin-157 und Serin-239-mit Hilfe der spezifischen Antikörper gegen beide Phosphorylierungsstellen blieb bis jetzt noch aus. Die vorliegende Arbeit hat sich diese Aufgabe zum Ziel gemacht.

Die im Folgenden aufgeführten Erkenntnisse zur Beteiligung von VASP an der Zellbeweglichkeit und der Adhärenz sind in der Literatur beschrieben worden. Im

humanpathogenen Bakterium *Listeria monocytogenes* ist z.B. eine Affinitätssteigerung von VASP zu F-Aktin nach seiner Phosphorylierung nachgewiesen worden. Diese Phosphorylierung führt zu Veränderung der Aktinpolymerisation und damit verbundener Steigerung der Beweglichkeit dieses Bakteriums (Reinhard et al., 1995; Reinhard et al., 1996; Charkraborty et al., 1995). In Thrombozyten scheint die VASP-Phosphorylierung an der Hemmung der Thrombozytenaggregation und an der Aktivierung des Fibrinogenrezeptors beteiligt zu sein (Aszodi et al., 1999; Hauser et al., 1999).

Nach Untersuchungen von Lawrence und Pryzwansky enthalten runde ruhende Neutrophile Granulozyten dephosphoryliertes VASP. Adhäsion und Ausbreitung der Neutrophilen Granulozyten ist jedoch mit schnellen VASP-Phosphorylierungsvorgängen begleitet. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz konnte auch die VASP-Umverteilung in Neutrophilen Granulozyten bei Adhäsion und Ausbreitung dieser Zellen nachgewiesen werden. So ließ sich VASP in ruhenden Zellen an der zellulären Kortex nachweisen. Während der Zellausbreitung erfolgte eine Umverteilung von VASP in die „*focal contacts*“ der ventralen adhärierenden Zelloberfläche. Doppelfärbung der Neutrophilen Granulozyten mit anti-Phospho-VASP-Antikörper und F-Aktin-Antikörper war beweisend für Co-Lokalisation dieser beiden Substanzen und ließ vermuten, dass VASP an dem Aufbau des fokalen Adhäsionskomplexes sowie auch an der Aktinpolymerisation und Bündelung in den Neutrophilen Granulozyten beteiligt ist (Pryzwansky, 1990; Lawrence und Pryzwansky, 2001).

Die hier vorliegende Arbeit untersuchte Serin-157- und Serin-239-Phosphorylierung in adhärerten Neutrophilen Granulozyten mit Hilfe der Immunfluoreszenz unter Verwendung der spezifischen Antikörper 5C6 und 16C2. Als Ergebnis konnte eine deutliche Serin-157- und Serin-239-Phosphorylierung in adhärerten Neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Diese Phosphorylierung ist nach anschließender Stimulation mit PG-E₁ nicht wesentlich angestiegen. Dieses Ergebnis beweist, dass die Phosphorylierung von Serin-157- und Serin-239-VASP an der Adhäsion der Neutrophilen Granulozyten beteiligt ist.

6.2 Aktivierung und Hemmung der p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1), der p38 MAPK und der Proteinkinase B in Neutrophilen Granulozyten

a) Aktivierung und Hemmung der MAPK

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1) sowie auch die p38 MAPK durch fMLP phosphoryliert werden (siehe Abbildungen 5.2.1 und 5.2.4). Diese Phosphorylierung und damit die Aktivierung konnte durch den Vasodilatator Flolan (Prostaglandin- I_2) gehemmt werden. Vasodilatoren PG-E₁ und SNP zeigten dagegen keine Hemmung der fMLP-induzierten Phosphorylierung dieser Moleküle (siehe Abbildungen 5.2.2 und 5.2.5).

Die MAPK und ihre Rolle in eukaryontischen Zellen ist bereits im Kapitel „Ergebnisse“ beschrieben worden. An dieser Stelle noch mal eine kurze Zusammenfassung.

MAPK sind in allen eukaryontischen Zellen vorhanden und bilden essentielle Bestandteile von komplexen Signalnetzen. Sie werden durch verschiedene Stimuli wie Chemokine, Wachstumsfaktoren und Hormone aktiviert und leiten die Proliferation und Differenzierung der Zelle ein (Seeger und Krebs, 1995). p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1) gehören zu den MAPK, die ein starkes Ansprechen auf die Signale der Wachstumsfaktoren zeigen, aber nur ein schwaches auf die Stressfaktoren wie UV-Licht, Hitzeschock und andere. Mehrere zytoplasmatische Proteine sind als Substrate der p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1) nachgewiesen worden, dazu gehören S6-Kinase p90^{rsk}, zytosolische Phospholipase A₂ und mehrere mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAP) (Seeger und Krebs, 1995; Widmann et al., 1999; Lin et al., 1993). p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1) sind auch an der Phosphorylierung von mehreren Transkriptionsfaktoren in dem Zellkern verantwortlich (Lenormand et al., 1993; Widmann et al., 1999). p38 MAPK wird eher unter dem Einfluss von zellulären Stressfaktoren phosphoryliert und damit aktiviert. UV-Strahlung, osmotischer Schock und Lipopolysaccharide (LPS) können als wichtigste Aktivatoren des p38-Signalweges genannt werden (Cobb and Goldsmith, 1995; Robinson and Cobb, 1997; Cano and Mahadevan, 1995). Zu den Substraten der p38 MAPK gehören MAPKAP (*MAPK-activated proteinkinase 2 und 3*), die das kleine 27 kDa-schwere Hitzeschock-Protein phosphorylieren (Rouse et al., 1994),

und mehrere Transkriptionsfaktoren. Über die Funktion von MAPK in den Neutrophilen Granulozyten ist bis jetzt wenig bekannt, jedoch scheinen sie eine entscheidende Rolle bei den biochemischen Vorgängen zu spielen, die für die Funktion der Neutrophilen Granulozyten als „Abwehrzellen“ verantwortlich sind (siehe auch Kapitel „Ergebnisse“). Dazu gehören Produktion von freien Sauerstoffradikalen, Adhäsion, Exozytose der exkretorischen Granula und viele andere (Park et al., 1997; Burg und Phillinger, 2001; Tores et al., 1993).

Da Vasodilatoren als Hemmer der MAPK-vermittelten Prozesse wie Sekretion der zytotoxischen Enzyme, Produktion der Sauerstoffradikale und Chemotaxis nachgewiesen worden sind (Burelout et al., 2004), kann der hemmende Effekt auf die Aktivierung der p42/p44 MAPK und p38 MAPK in Neutrophilen Granulozyten vermutet werden. Wie oben schon beschrieben, gehören Vasodilatoren zu cAMP- oder cGMP-erhöhenden Substanzen. Zyklische Nukleotide cAMP und cGMP fungieren in den Zellen als „second messenger“. Die werden durch membrangebundene Adenylatzyklase bzw. Guanylatzyklase nach Bindung der Vasodilatoren am spezifischen, G-Protein-kontrollierten Rezeptor gebildet.

In verschiedenen Zelltypen scheinen cAMP und cGMP sehr unterschiedliche Wirkung auf die Aktivität der p42/p44 MAPK sowie p38 MAPK zu haben. In Swiss 3T3 Fibroblasten (Faure und Bourne, 1995), COS-7- Affennierenzellen (Faure und Bourne, 1995) und in einer myeloiden Vorläuferzelllinie der 32D-Zellen (Lee, 1999) führten cAMP oder cAMP-stimulierende Substanzen zu einer Aktivierung von p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1). In glatten Muskelzellen der arteriellen Gefäße (Graves et al., 1993), in kortikalen Astrozyten (Kurino et al., 1996) und in Thrombozyten (Schwarz, 2001) wurden hingegen p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1) durch cAMP oder cAMP-stimulierende Substanzen gehemmt. Die cGMP oder cGMP-erhöhende Substanzen aktivierten p42/p44 MAPK in mesangialen Zellen der Rattenniere (Callsen et al., 1998), humanen T-Zellen (Lander et al., 1996) und koronarvenösen Endothelzellen (Parenti et al., 1998). Im Gegensatz dazu hemmten cGMP-Analoga die MAPK-Aktivierung in cGMP-PK exprimierenden Nierenzellen aus Hamsterbabys (Suhasini et al, 1998).

Es existieren mehrere Arbeiten, die eine Aktivierung und Hemmung der p38 MAPK in unterschiedlichen Zellen in Abhängigkeit von cAMP und cGMP beschreiben. So

hemmt cAMP die Aktivierung der p38 MAPK in humanen umbilikalen Endothelzellen (Rahman et al., 2004) und in humanen Thrombozyten (Schwarz, 2001). Auch cGMP scheint die Aktivierung der p38 MAPK in Thrombozyten zu hemmen (Schwarz, 2001). In den Fettzellen der Ratte wurde p38 MAPK dagegen durch cAMP und cGMP aktiviert (Moule and Denton, 1998).

Zahlreiche chemotaktische Faktoren, dazu gehört auch fMLP, führen zur Phosphorylierung der p42/p44 MAPK und p38 MAPK. Diese Phosphorylierung wird auch in der vorliegenden Arbeit dargestellt, es wurden auch die Auswirkungen der cAMP-erhöhenden Substanzen wie PG-E₁ und Flolan (Prostaglandin-I₂) sowie der cGMP-erhöhenden Substanzen wie SNP auf die Aktivierung von MAPK untersucht. Wie man aus dem Kapitel „Ergebnisse“ entnehmen kann, zeigt Flolan, jedoch nicht PG-E₁ oder SNP einen hemmenden Einfluss auf Phosphorylierung der p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1) und der p38 MAPK unter der Einwirkung von fMLP.

Flolan und PG-E₁ gehören zu cAMP-erhöhenden Substanzen, SNP gehört zu cGMP-erhöhenden Substanzen. Weder cAMP-PK noch cGMP-PK besitzen ein Phosphorylierungsmotiv für p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1) oder p38 MAPK. Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, dass die Regulation der MAPK über vorgeschaltete Wege verläuft.

Vor kurzem erschien eine Studie, die vom PACAP (*puritary adenylate cyclase-activating protein*), einem proinflammatorischen Molekül mit Wirkung auf Neutrophile Granulozyten, berichtet hat (Harfi et al., 2004). In dieser Studie ist eine Phosphorylierung und damit eine Aktivierung der p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1) und p38 MAPK unter Einwirkung des PACAP beschrieben worden. PACAP hat eine proinflammatorische, also fMLP-ähnliche Wirkung auf Neutrophile Granulozyten. In dieser Studie konnte die Aktivierung der p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1) durch eine Präinkubation mit U73122, einem irreversiblen Hemmer von Phospholipase C (PLC), unterdrückt werden. Wenn man bedenkt, dass eine Hemmung der PLC durch cAMP-erhöhende Substanzen schon seit langem nachgewiesen worden ist (Mueller et al., 1989, Agwu et al., 1991), wird es klar, dass in der vorliegenden Arbeit gezeigter hemmender Einfluss von Flolan auf die fMLP-induzierte Phosphorylierung der p42/p44 MAPK eine Folge der Flolan-vermittelten Hemmung der PLC sein kann.

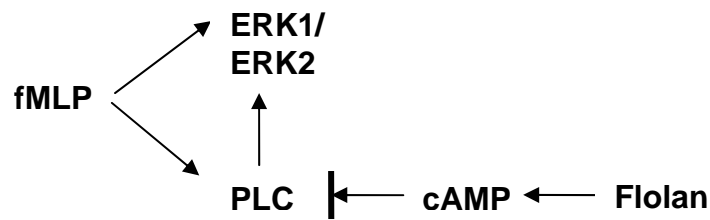


Abbildung 6.2.1 Möglicher Weg, wie Flolan fMLP-induzierte Phosphorylierung der p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1) hemmen kann.

Wie es aus der Literatur zu entnehmen ist, scheint die Aktivierung der p38 MAPK hingegen unabhängig von der PLC zu sein. Hier ist wahrscheinlich ein anderer Weg, z.B. durch PI3K, verantwortlich. Als Hypothese kann z. B. eine bereits gezeigte cAMP-induzierte Hemmung der PI3K angenommen werden (Burelout et al., 2004). Ein Zusammenhang zwischen PI3K und p38 MAPK ist auch bereits beschrieben worden, so kann Wortmannin, ein Inhibitor der PI3K, die Aktivierung der p38 MAPK unterdrücken (Yamomori und Inanami, 2002). Da PI3K Proteinkinase B (PKB) als Substrat hat, würde diese Hypothese auch die in der vorliegenden Arbeit dargestellte cAMP-induzierte PKB-Hemmung erklären (siehe auch weiter unten).

Wie oben beschrieben, bestehen starke Hinweise darauf, dass cGMP-PK wenn überhaupt, nur in ganz kleinen Mengen in Neutrophilen Granulozyten vorhanden ist. Deshalb ist ein fehlender Effekt des SNP, einer cGMP-erhöhenden Substanz, auf die fMLP-induzierte Phosphorylierung der p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1) und der p38 MAPK gar nicht so überraschend. In Thrombozyten dagegen, die große Mengen der cGMP-PK enthalten, ist ein hemmender Effekt der cGMP-erhöhenden Substanzen auf die Aktivierung von MAPK bereits nachgewiesen worden (Schwarz, 2001). Der genaue Mechanismus dieser Hemmung ist jedoch bis jetzt unbekannt.

Warum Flolan, jedoch nicht PG-E₁ zu Hemmung der fMLP-induzierten p42/p44 MAPK (Erk2/Erk1) sowie zu Phosphorylierung der p38 MAPK führt, wird durch das oben Gesagte noch nicht beleuchtet. Hier können interindividuelle Unterschiede bei dem Ansprechen auf Vasodilatoren eine Rolle spielen.

a) Aktivierung und Hemmung der Proteinkinase B

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass PKB unter dem Einfluss von fMLP phosphoryliert wird (siehe Abbildung 5.2.7). Diese Phosphorylierung und damit die Aktivierung können durch den Vasodilatator Flolan, jedoch nicht durch Vasodilatoren PG-E₁ oder SNP gehemmt werden (siehe Abbildung 5.2.8).

Welche Rolle PKB in eukaryontischen Zellen spielt, ist bereits im Kapitel „Ergebnisse“ beleuchtet worden. Hier noch mal eine kurze Zusammenfassung. PKB/Akt ist ursprünglich als ein humanes intrazelluläres Homologon des Onkogens *v-Akt* aus dem Retrovirus Akt 8 beschrieben worden (Bellacosa et al., 1991; Coffey and Woodgett, 1991). Zu den Substraten der PKB gehören Proteine, die an der Regulation der Apoptose beteiligt sind. Als Beispiel können hier *Bad*, ein Mitglied der *bcl-2* Familie sowie *FKHR*, ein Transkriptionsfaktor, genannt werden. Eine Phosphorylierung von *Bad* und *FKHR* durch aktivierte PKB verhindert, dass Prozesse der Apoptose in Gang gesetzt werden. Auch weitere Proteine, die die Apoptose regulieren, gehören zu den Substraten der PKB (siehe Kapitel „Ergebnisse“). Die Rolle der PKB bei der Hemmung der Apoptose in den Neutrophilen Granulozyten ist noch relativ wenig untersucht. Besser bekannt ist die Rolle der PKB bei biochemischen Vorgängen, die für Aktivierung der Neutrophilen Granulozyten verantwortlich sind. So scheint PKB eine entscheidende Rolle bei solchen Prozessen wie Phagozytose und oxidativem Stress zu spielen (Tilton, 1997, Thelen, 1995).

Die vorliegende Arbeit beleuchtet die Auswirkungen der cAMP-erhöhenden Substanzen wie PG-E₁ und Flolan (Prostaglandin-I₂) sowie der cGMP-erhöhenden Substanzen wie SNP auf die Aktivierung von PKB. Wie man dem Kapitel „Ergebnisse“ entnehmen kann, zeigt Flolan, jedoch nicht PG-E₁ oder SNP einen hemmenden Einfluss auf PKB-Phosphorylierung unter der Einwirkung von fMLP.

Bis heute existieren nur wenige Publikationen, die einen Zusammenhang zwischen cAMP, cGMP und PKB zeigen. Bekannt ist z.B. ein hemmender Effekt von NO, eines cGMP-PK-Stimulators, auf die PDGF-induzierte (PDGF=*platelet derived growth*

6. DISKUSSION

factor) Phosphorylierung der PKB in glatten Gefäßmuskelzellen (Sandirasegarane et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte ein fehlender Effekt des SNP, eines cGMP-PK-Stimulators, auf die Aktivierung der PKB festgestellt werden. Wie auch schon oben beschrieben, besitzen Neutrophile Granulozyten, wenn überhaupt, nur geringe Mengen von cGMP-PK. Deshalb war der fehlende Effekt von SNP auf die Aktivierung von PKB zu erwarten.

Für cAMP-PK-Stimulatoren fehlen bis jetzt Studien, die einen Einfluss auf Hemmung oder Aktivierung der PKB nachweisen. In der vorliegenden Arbeit dargestellte Experimente zeigen einen hemmenden Effekt des Flolans, eines cAMP-PK-Aktivators, auf die fMLP-induzierte Phosphorylierung der PKB. Da cAMP-PK kein Phosphorylierungsmotiv für PKB besitzt, ist es wahrscheinlich, dass die Regulation der PKB über einen anderen Weg, z.B. durch die vorgeschaltete PI3K verläuft. Eine Hemmung der PI3K unter dem Einfluss der cAMP-erhöhenden Substanzen ist bereits nachgewiesen worden (Berelout et al., 2004).

Auch bei Hemmung der PKB lässt es sich nicht genau erklären, warum Flolan (Prostaglandin- I_2), jedoch nicht PG- E_1 zu Hemmung der fMLP-induzierten Phosphorylierung der PKB führt. Interindividuelle Unterschiede können genauso wie bei der Hemmung der p42/p44 MAPK und der p38 MAPK eine entscheidende Rolle spielen.

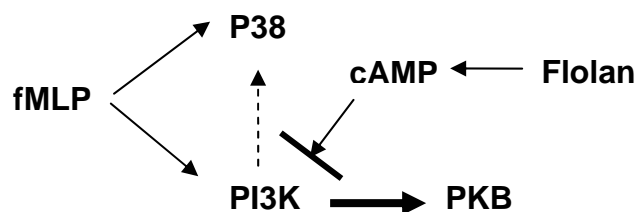


Abbildung 6.2.2 Möglicher Weg, wie Flolan fMLP-induzierte Phosphorylierung der PKB und der p38 MAPK hemmen kann.

7. Zusammenfassung

Neutrophile Granulozyten sind wichtige Effektorzellen des menschlichen Immunsystems. Eine Suppression der Neutrophilen Granulozyten kann zur Immundefizienz mit der Gefahr der Entstehung von bakteriellen Infektionen und malignen Tumoren führen, eine Überstimulation dieser Zellen ist jedoch an der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen beteiligt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden aktivierende und hemmende Signalwege untersucht, die für zukünftige Strategien in der Prävention und Therapie von Erkrankungen mit Beteiligung Neutrophiler Granulozyten eine wichtige Rolle spielen könnten.

Neutrophile Granulozyten enthalten das Signalprotein VASP in hoher Konzentration. VASP ist ein bereits gut charakterisiertes Substrat der cAMP- und der cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cAMP- und cGMP-PK), einer Gruppe von Kinasen, welche Zelladhäsion, Zellmigration und Zellteilung regulieren. Phosphorylierungsversuche mit cAMP-erhöhenden Substanzen ergaben eine rasche, reversible Phosphorylierung des Proteins VASP an Serin-157 und an Serin-239 in intakten humanen Neutrophilen Granulozyten. Versuche mit cGMP-erhöhenden Substanzen zeigten ebenfalls eine Phosphorylierung an Serin-157, jedoch keine Phosphorylierung an Serin-239.

Basierend auf der Methode der Immunfluoreszenz wurde gezeigt, dass VASP bei der Adhäsion Neutrophiler Granulozyten an Serin-157 und an Serin-239 bereits maximal phosphoryliert wird. Nach zusätzlicher Stimulation mit PG-E₁ zeigte sich kein weiterer Anstieg der Phosphorylierung in adhärenierten Neutrophilen Granulozyten.

Zahlreiche chemotaktische Faktoren wie fMLP führen zur Phosphorylierung der p42/p44 MAPK, der p38 MAPK sowie der Proteinkinase B (PKB). Diese intrazellulären Signalmoleküle spielen eine zentrale Rolle bei der Neutrophilenaktivierung. Da es bereits Hinweise auf die hemmenden Einflüsse von Vasodilatoren auf die Aktivierung Neutrophiler Granulozyten gab, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von cAMP- und cGMP-erhöhenden Substanzen auf die fMLP-induzierte Aktivierung der p42/p44 MAPK, der p38 MAPK sowie der PKB

7. ZUSAMMENFASSUNG

untersucht. Prostazyklin I₂, ein physiologischer cAMP-erhöhender Vasodilatator, führte zur signifikanten Hemmung der fMLP-induzierten p42/p44 MAPK, der p38 MAPK sowie zur Phosphorylierung der PKB. Der NO-freisetzende und cGMP-erhöhende Vasodilatator Natriumnitroprussid zeigte jedoch keinen Einfluss auf die fMLP-induzierte Aktivierung dieser Signalmoleküle. Physiologisch vorkommende cAMP-erhöhende Substanzen besitzen im menschlichen Körper eine wichtige regulatorische Funktion, die Neutrophile Granulozyten vor der „Überstimulation“ bewahren.

Diese Ergebnisse zeigen, dass cAMP- und cGMP-erhöhende Vasodilatoren intrazelluläre Signalkaskaden der Neutrophilen Granulozyten regulieren, wobei insbesondere den cAMP-regulierten Signalkaskaden eine größere Bedeutung in der Hemmung Neutrophiler Granulozyten zukommt.

8. Literaturverzeichnis

Agwu D.E., McCall C.E., McPhail L.C. (1991)

Regulation of phospholipase D-induced hydrolysis of choline-containing phosphoglycerides by cyclic AMP in human neutrophils.

J. Immunol. 146(11):3895-903

Ahmed M.U., Hazeki K., Hazeki O., Katada T., Ui M. (1995)

Cyclic AMP-increasing agents interfere with chemoattractant-induced respiratory burst in neutrophils as a result of the inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase rather than receptor-operated Ca²⁺ influx.

J. Biol. Chem. 270(40):23816-22

Alessi D.R., Andjelkovic M., Caudwell B., Cron P., Morrice N., Cohen P., Hemmings B.A.(1996)

Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1.

EMBO J. 15(23):6541-51

Anderson R., Glover A., Rabson A.R. (1977)

The in vitro effects of histamine and metiamide on neutrophil motility and their relationship to intracellular cyclic nucleotide levels.

J. Immunol. 118(5):1690-6

Aszódi A., Pfeifer A., Ahmad M., Glauner M., Zhou X.-H., Ny L., Andersson K.-E., Kehrel B., Offermanns S., Fässler R. (1999)

The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function.

EMBO J. 18:37-48

Baggiolini M., Dewald B., Moser B. (1997)

Human chemokines: an update.

Annu. Rev. Immunol. 15:675-705

Bassler R., Dittmann A.M., Dittrich M. (1981)

Mononuclear stromal reactions in mammary carcinoma, with special reference to medullary carcinomas with a lymphoid infiltrate. Analysis of 108 cases.

Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histol. 393(1):75-91

Becker B.F., Massoudy P., Permanetter B., Raschke P., Zahler S. (1993)

Possible significance of free oxygen radicals for reperfusion injury.

Z. Kardiol. 82 Suppl. 5:49-58

Bellacosa A., Testa J.R., Staal S.P., Tsichlis P.N. (1991)

A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region.

Science 254(5029):274-7

Bevilacqua M., Vago T., Baldi G., Renesto E., Dallegri F., Norbiato G. (1994)

Nimesulide decreases superoxide production by inhibiting phosphodiesterase type IV.

Eur. J. Pharmacol. 268(3):415-23

Biasi D., Carletto A., Caramaschi P., Bonella F., Bambara V., Pacor M.L., Bambara L.M. (2003)

Neutrophils in rheumatoid inflammation.

Recenti. Prog. Med. 94(1):25-30

Black M.M., Barclay T.H., Hankey B.F. (1975)

Prognosis in breast cancer utilizing histologic characteristics of the primary tumor.

Cancer 36(6):2048-55

Blumer K.J., Johnson G.L. (1994)

Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways.

Trends Biochem. Sci. 19(6):236-40

Bokoch G.M. (1995)

Chemoattractant signaling and leukocyte activation.

Blood 86(5):1649-60

Borregaard N., Cowland J. B. (1997)

Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte.

Blood 89(10):3503-3521

Breyer R.M., Bagdassarian C.K., Myers S.A., Breyer M.D. (2001)

Prostanoid receptors: subtypes and signaling.

Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 41:661-90

Brownawell A.M., Kops G.J., Macara I.G., Burgering B.M. (2001)

Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX.

Mol. Cell Biol. 21(10):3534-46

Brunet A., Bonni A., Zigmond M.J., Lin M.Z., Juo P., Hu L.S., Anderson M.J., Arden K.C., Blenis J., Greenberg M.E. (1999)

Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor.

Cell 96:857-868

Bruno O., Brullo C., Arduino N., Schenone S., Ranise A., Bondavalli F., Ottonello L., Dapino P., Dallegri F. (2004)

Synthesis and biological evaluation of neutrophilic inflammation inhibitors.

Farmaco 59(3):223-35

Burelout C., Thibault N., Levasseur S., Simard S., Naccache P.H., Bourgoin S.G. (2004)

Prostaglandin E2 inhibits the phospholipase D pathway stimulated by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. Involvement of EP2 receptors and phosphatidylinositol 3-kinase gamma.

Mol. Pharmacol. 66(2):293-301

Burelout C., Thibault N., Levasseur S., Simard S., Naccache P.H., Bourgoin S.G. (2004)

Prostaglandin E2 inhibits the phospholipase D pathway stimulated by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. Involvement of EP2 receptors and phosphatidylinositol 3-kinase gamma.

Mol. Pharmacol. 66(2):293-301

Burg N.D., Pillinger M.H. (2001)

The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity.

Clin. Immunol. 99(1):7

Butt E., Abel K., Krieger M., Palm D., Hoppe V., Hoppe J. and Walter U. (1994)

cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets.

J. Biol. Chem. 269 (20), 14509-14517

Butt E., Nolte C., Schulz S., Beltman J., Beavo J.A., Jastorff B., Walter U. (1992)

Analysis of the functional role of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets using a specific activator 8-para-chlorophenylthio-cGMP.

Biochem. Pharmacol. 43(12):2591-600

Callsen D., Pfeilschifter J., Brune B. (1998)

Rapid and delayed p42/p44 mitogen-activated protein kinase activation by nitric oxide: the role of cyclic GMP and tyrosine phosphatase inhibition

J. Immunol. 61(9):4852-8

Cano E., Mahadevan L.C. (1995)

Parallel signal processing among mammalian MAPKs.

Trends Biochem. Sci. 20(3):117-22

Cantley L.C., Neel B..G. (1999)

New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 96(8):4240-5

Chakraborty T., Ebel F., Domann E., Niebuhr K., Gerstel B., Pistor S., Temm-Grove C.J., Jockusch B.M., Reinhard M., Walter U. (1995)

A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells.

EMBO J. 14(7):1314-21

Chakraborty T., Mandal A., Mandal M., Das S., Chakraborti S. (2000)

Complement activation in heart diseases. Role of oxidants.

Cell Signal 12(9-10):607-17

Cobb M.H., Goldsmith E.J (1995)

How MAP kinases are regulated.

J. Biol. Chem. 270(25):14843-6

Coffer P.J., Jin J., Woodgett J.R. (1998)

Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation.

J. Biochem. 335:1 -13

Coffer P.J., Woodgett J.R. (1991)

Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families.

Eur. J. Biochem. 201(2):475-81

Cohen P. (1997)

The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells.

Trends in CELL Biology 7:353-359

Cronstein B.N., Eberle M.A., Gruber H.E., Levin R.I. (1991)

Methotrexate inhibits neutrophil function by stimulating adenosine release from connective tissue cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 15;88(6):2441-5

Dalpiaz A., Spisani S., Biondi C., Fabbri E., Nalli M., Ferretti M.E. (2003)

Studies on human neutrophil biological functions by means of formyl-peptide receptor agonists and antagonists.

Curr. Drug. Targets Immune. Endocr. Metabol. Disord. 3(1):33-42

Darius H., Grodzinska L., Meyer J. (1992)

The effects of the nitric oxide donors molsidomine and SIN-I on human polymorphonuclear leucocyte function in vitro and ex vivo.

Eur. J. Clin. Pharmacol. 43(6):629-33

Datta S.R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y., Greenberg M.E. (1997)

Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery.

Cell 91:231-241

Del Maschio A., Zanetti A., Corada M., Rival Y., Ruco L., Lampugnani M. G., Dejana E. (1996)

Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions.

J. Cell Biol. 135(2):497-510

Di Carlo E., Forni G., Lollini P., Colombo M.P., Modesti A., Musiani P.

(2001)

The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions.

Blood 97(2):339-45

Diacovo T. G., Roth S. J., Buccola J. M., Bainton D. F., Springer T. A. (1996)

Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin

CD11b/CD18.

Blood 88(1):146-157

Draijer R., Vaandrager A.B., Nolte C., de Jonge H.R., Walter U., van

Hinsbergh V.W. (1995)

Expression of cGMP-dependent protein kinase I and phosphorylation of its substrate, vasodilator-stimulated phosphoprotein, in human endothelial cells of different origin.

Circ. Res. 77(5):897-905

Dudek H., Datta S.R., Franke T.F., Brinbaum M., Yao R., Cooper G.M., Segal R.A., Kaplan D.R., Greenberg M.E. (1997)

Regulation of neuronal survival by the serinethreonine protein kinase Akt.

Science 275:661-665

Eigenthaler M., Nolte C., Halbrugge M., Walter U. (1992)

Concentration and regulation of cyclic nucleotides, cyclic-nucleotide-dependent protein kinases and one of their major substrates in human platelets. Estimating the rate of cAMP-regulated and cGMP-regulated protein phosphorylation in intact cells.

Eur. J. Biochem. 205(2):471-81

Eigenthaler M., Ullrich H., Geiger J., Horstrup K., Honig-Liedl P., Wiebecke D., Walter U. (1993)

Defective nitrovasodilator-stimulated protein phosphorylation and calcium regulation in cGMP-dependent protein kinase-deficient human platelets of

chronic myelocytic leukemia.

J. Biol. Chem. 268(18):13526-31

Eigenthaler M., Klippel E., Nolte C., Walter U. (1994)

Endothelial cell-dependent protein phosphorylation and inhibition of the fMLP-induced calcium response in human neutrophils.

Biology of Nitric Oxides, Portland Press 179-182

Elferink J.G., de Koster B.M., Boonen G.J., de Priester W. (1992)

Inhibition of neutrophil chemotaxis by purinoceptor agonists.

Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 317:93-106

Elferink J.G., de Koster B.M. (1993)

The effect of cyclic GMP and cyclic AMP on migration by electroporated human neutrophils.

Eur. J. Pharmacol. 246(2):157-61

Elferink J.G., VanUffelen B.E. (1996)

The role of cyclic nucleotides in neutrophil migration.

Gen. Pharmacol. 27(2):387-93

Faure M., Bourne H.R. (1995)

Differential effects on cAMP on the MAP kinase cascade: evidence for a cAMP-insensitive step that can bypass Raf-1.

Mol. Biol. Cell. 6(8):1025-35

Feng D., Nagy J. A., Pyne K., Dvorak H. F., Dvorak A. M. (1998)

Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP.

J. Experimental Medicine 187(6):903-915

Fontayne A., Dang P.M., Gougerot-Pocidallo M.A., El-Benna J. (2002)

Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation.

Biochemistry 41(24):7743-50

Friedman G.D., Klatsky A.L., Siegelau A.B. (1974)

The leukocyte count as a predictor of myocardial infarction.

N. Engl. J. Med. 290(23):1275-8

Furchgott R.F., Vanhoutte P.M. (1989)

Endothelium-derived relaxing and contracting factors.

FASEB J. 3(9):2007-18

Geiger J., Nolte C., Butt E., Sage S.O., Walter U. (1992)

Role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in nitrovasodilator inhibition of agonist-evoked calcium elevation in human platelets.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89(3):1031-5

Graves L.M., Bornfeldt K.E., Raines E.W., Potts B.C., MacDonald S.G., Ross R., Krebs E.G. (1993)

Protein kinase A antagonizes platelet-derived growth factor-induced signaling by mitogen-activated protein kinase in human arterial smooth muscle cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90(21):10300-4

Grinstein S., Furuya W. (1992)

Chemoattractant-induced tyrosine phosphorylation and activation of microtubule-associated protein kinase in human neutrophils.

J. Biol. Chem. 267(25):18122-5

Hafner C., Meyer S., Vogt T. (2002)

Mechanismen der epithelialen Regeneration.

Hautarzt 53:561–575

Hata A.N., Breyer R.M. (2004)

Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation.

Pharm. Ther. 103(2):147-66

Halbrugge M., Friedrich C., Eigenthaler M., Schanzenbacher P., Walter U. (1990)

Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46 kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators.

J. Biol Chem. 265(6):3088-93

Halbrugge M., Walter U. (1989)

Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets.

Eur. J. Biochem. 185(1):41-50

Hamlin I.M. (1968)

Possible host resistance in carcinoma of the breast: a histological study.

Br. J. Cancer 22(3):383-401

Han C.H., Freeman J.L., Lee T., Motalebi S.A., Lambeth J.D. (1998)

Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67 (phox).

J. Biol. Chem. 273(27):16663-8

Harfi I., D'Hondt S., Corazza F., Sariban E. (2004)

Regulation of human polymorphonuclear leukocytes functions by the neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide after activation of MAPKs.J.

Immunol. 173(6):4154-63

Hauser W., Knobloch K.-P., Eigenthaler M., Gambaryan S., Krenn V., Geiger J., Glazova M., Rohde E., Horak I., Walter U., Zimmer M. (1999)

Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice.

PNAS 96(14): 8120-8125

Hecker G., Ney P., Schror K. (1990)

Cytotoxic enzyme release and oxygen centered radical formation in human neutrophils are selectively inhibited by E-type prostaglandins but not by PGI₂. Naunyn.

Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 341(4):308-15

Hill H.R., Estensen R.D., Quie P.G., Hogan N.A., Goldberg N.D. (1975)

Modulation of human neutrophil chemotactic responses by cyclic 3',5'-guanosine monophosphate and cyclic 3',5'-adenosine monophosphate.

Metabolism 24(3):447-56

Hiraguri M., Miike S., Sano H., Kurasawa K., Saito Y., Iwamoto I. (1997)

Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IL-5 activate mitogen-activated protein kinase through Jak2 kinase and phosphatidylinositol 3-kinase in human eosinophils.

J. Allergy Clin. Immunol. 100(6 Pt 2):S45-51

Holt M.R., Critchley D.R., Brindle N.P. (1998)

The focal adhesion phosphoprotein VASP.

Int. J. Biochem. Cell Biol. 30(3):307-11

Jiang H., Colbran J.L., Francis S.H., Corbin J.D. (1992)

Direct evidence for cross-activation of cGMP-dependent protein kinase by cAMP in pig coronary arteries.

J. Biol. Chem. 267(2):1015-9

Klippel (1997)

Die Regulation der intrazellulären Signalwege in humanen Neutrophilen Granulozyten unter besonderer Berücksichtigung der cAMP- und cGMP-regulierten Proteinphosphorylierung.

Medizinische Doktorarbeit

Julius-Maximilian Universität Würzburg

Knall C., Worthen G. S., Johnson G. L. (1997)

Interleukin 8-stimulated phosphatidylinositol-3-kinase activity regulates the

migration of human neutrophils independent of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94(7):3052-3057

Komalavilas P., Lincoln T.M. (1996)

Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta.

J. Biol. Chem. 271(36):21933-8

Kurino M., Fukunaga K., Ushio Y., Miyamoto E. (1996)

Cyclic AMP inhibits activation of mitogen-activated protein kinase and cell proliferation in response to growth factors in cultured rat cortical astrocytes.

J. Neurochem. 67(6):2246-55

Kyriakis J.M., Banerjee P., Nikolakaki E., Dai T., Rubie E.A., Ahmad M.F., Avruch J., Woodgett J.R. (1994)

The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases.

Nature 369(6476):156-60

Lander H.M., Jacovina A.T., Davis R.J., Tauras J.M. (1996)

Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species.

J. Biol. Chem. 71(33):19705-9

Laudanna C., Campbell J. J., Butcher E. C. (1996)

Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins.

Science 271(5251): 981-983

Lawrence D.W., Pryzwansky K.B. (2001)

The vasodilator-stimulated phosphoprotein is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase during neutrophil spreading.

J. Immunol. 166(9):5550-6

Lee A.W. (1999)

Synergistic activation of mitogen-activated protein kinase by cyclic AMP and myeloid growth factors opposes cyclic AMP's growth-inhibitory effects.

Blood 93(2):537-53

Leevers S.J., Vanhaesebroeck B., Waterfield M.D. (1999)

Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage.

Curr. Opin. Cell Biol. 11:219-225

Lenormand P., Sardet C., Pages G., L'Allemain G., Brunet A. Pouyssegur J. (1993)

Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts.

J. Cell Biol. 122(5):1079-88

Li Z., Ajdic J., Eigenthaler M., Du X. (2003)

A predominant role for cAMP-dependent protein kinase in the cGMP-induced phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein and platelet inhibition in humans.

Blood 101(11):4423-9

Lin C.S., Liu X., Tu R., Chow S., Lue T.F. (2001)

Age-related decrease of protein kinase G activation in vascular smooth muscle cells.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 287(1):244-8

Lin L.L., Wartmann M, Lin A.Y., Knopf J.L., Seth A., Davis R.J. (1993)

cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase.

Cell 72(2):269-78

Lincoln T.M., Cornwell T.L., Taylor A.E. (1990)

cGMP-dependent protein kinase mediates the reduction of Ca²⁺ by cAMP in

vascular smooth muscle cells.

Am. J. Physiol. 258(3 Pt 1):C399-407

Lorant D. E., Topham M. K., Whatley R. E., McEver R. P., McIntyre T. M., Prescott S. M., Zimmerman G. A. (1993)

Inflammatory roles of P-selectin.

J. Clinical Investigation 92(2):559-570

McEver R.P., Cummings R.D. (1997)

Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment.

J. Clinical Investigation 100(11 SUPPL): S97-S103

McEver R. P., Moore K. L., Cummings R. D. (1995)

Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions.

J. Biol. Chem. 270(19):11025-11028

Mitchell M. A., Huang M. M., Chien P., Indik Z. K., Pan X. Q., Schreiber A. D. (1994)

Substitutions and deletions in the cytoplasmic domain of the phagocytic receptor Fc gamma RIIA: effect on receptor tyrosine phosphorylation and phagocytosis.

Blood 84(6): 1753-1759

Moule S.K., Denton R.M. (1998)

The activation of p38 MAPK by the beta-adrenergic agonist isoproterenol in rat epididymal fat cells.

FEBS Lett. 439(3):287-90

Mueller H., Montoya B., Sklar L.A. (1992)

Reversal of inhibitory pathways in neutrophils by protein kinase antagonists: a rational approach to the restoration of depressed cell function?

J. Leukoc. Biol. 52(4):400-6

Mueller H., Sklar L.A. (1989)

Coupling of antagonistic signalling pathways in modulation of neutrophil

function.

J. Cell Biochem. 40(3):287-94

Murga C., Laguinge L., Wetzker R., Cuadrado A., Gutkind J.S. (1998)

Activation of Akt/protein kinase B by G protein-coupled receptors. A role for alpha and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH kinase gamma.

J. Biol. Chem. 273:19080-19085

Nobes C. D., Hall A. (1995)

Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility.

Biochem. Society Transactions 23(3): Pages 456-459

Parenti A., Morbidelli L., Cui X.L., Douglas J.G., Hood J.D., Granger H.J., Ledda F., Ziche M. (1998)

Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium.

J. Biol. Chem. 73(7):4220-6

Park J.W., Hoyal C.R., Benna J.E., Babior B.M. (1997)

Kinase-dependent activation of the leukocyte NADPH oxidase in a cell-free system. Phosphorylation of membranes and p47(PHOX) during oxidase activation.

J. Biol. Chem. 272(17):11035-43

Perussia B., Dayton E. T., Lazarus R., Fanning V., Trinchieri G. (1983)

Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG1 on human monocytic and myeloid cells.

J. Experimental Medicine 158(4):1092-1113

Pillinger M.H., Abramson S.B. (1995)

The neutrophil in rheumatoid arthritis.

Rheum. Dis. Clin. North. Am. 21(3):691-714

Pryzwansky K.B., Kidao S., Wyatt T.A., Reed W., Lincoln T.M. (1995)

Localization of cyclic GMP-dependent protein kinase in human mononuclear phagocytes.

J. Leukoc. Biol. 57(4):670-8

Pryzwansky K.B., Wyatt T.A., Nichols H., Lincoln T.M. (1990)

Compartmentalization of cyclic GMP-dependent protein kinase in formyl-peptide stimulated neutrophils.

Blood 76(3):612-8

Quilliam L.A., Mueller H., Bohl B.P., Prossnitz V., Sklar L.A., Der C.J., Bokoch G.M. (1991)

Rap1A is a substrate for cyclic AMP-dependent protein kinase in human neutrophils.

J. Immunol. 147(5):1628-35

Quinn M.T. (1995)

Low-molecular-weight GTP-binding proteins and leukocyte signal transduction.

J. Leukoc. Biol. 58(3):263-76

Rahman A., Anwar K.N., Minhajuddin M., Bijli K.M., Javaid K., True A.L., Malik A.B. (2004)

cAMP targeting of p38 MAP kinase inhibits thrombin-induced NF- κ B activation and ICAM-1 expression in endothelial cells.

Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 87(5):L1017-L1024

Reinhard M., Giehl K., Abel K., Haffner C., Jarchau T., Hoppe V., Jockusch B.M., Walter U. (1995)

The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins.

EMBO J. 14(8):1583-9

Reinhard M., Halbrugge M., Scheer U., Wiegand C., Jockusch B.M., Walter U. (1992)

The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts.

EMBO J. 11(6):2063-70

Reinhard M., Jouvenal K., Tripier D., Walter U. (1995)

Identification, purification, and characterization of a zyxin-related protein that binds the focal adhesion and microfilament protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein).

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92(17):7956-60

Reinhard M., Rudiger M., Jockusch B.M., Walter U. (1996)

VASP interaction with vinculin: a recurring theme of interactions with proline-rich motifs.

FEBS Lett. 399(1-2):103-7

Ren G., Dewald O., Frangogiannis N.G. (2003)

Inflammatory mechanisms in myocardial infarction.

Curr. Drug. Targets Inflamm. Allergy. 2(3):242-56

Riede U.N. und Schäfer H.E. (2004)

Pathologie.

Thieme Verlag

Robinson M.J., Cobb M.H. (1997)

Mitogen-activated protein kinase pathways.

Curr. Opin. Cell Biol. 9(2):180-6

Rossomando A.J., Payne D.M., Weber M.J., Sturgill T.W. (1989)

Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86(18):6940-3

Rouse J., Cohen P., Trigon S., Morange M., Alonso-Llamazares A., Zamanillo D., Hunt T., Nebreda A.R. (1994)

A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins.

Cell 78(6):1027-37

Sandberg M., Butt E., Nolte C., Fischer L., Halbrugge M., Beltman J., Jahnsen T., Genieser H.G., Jastorff B., Walter U. (1991)

Characterization of Sp-5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole- 3',5'-monophosphorothioate (Sp-5,6-DCI-cBiMPS) as a potent and specific activator of cyclic-AMP-dependent protein kinase in cell extracts and intact cells.

J. Biochem. 279 (Pt 2):521-7

Sandrasegaran L., Charles R., Bourbon N., Kester M. (2000)

NO regulates PDGF-induced activation of PKB but not ERK in A7r5 cells: implications for vascular growth arrest.

Am. J. Physiol. Cell Physiol. 279(1):C225-35

Sausbier M., Schubert R., Voigt V., Hirneiss C., Pfeifer A., Korth M., Kleppisch T., Ruth P., Hofmann F. (2000)

Mechanisms of NO/cGMP-Dependent Vasorelaxation

Circulation Research 87:825

Saxon A., Kattlove H.E. (1976)

Platelet inhibition by sodium nitroprusside, a smooth muscle inhibitor.

Blood 47(6):957-61

Schwarz U. (2001)

Biochemische und Molekularbiologische Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen Humanen Thrombozyten und Endothelzellen.

Doktorarbeit Julius-Maximilian Universität Würzburg

Seger R., Krebs E.G. (1995)

The MAPK signaling cascade.

FASEB J. 9(9):726-35

Sheth K., De A., Nolan B., Friel J., Duffy A., Ricciardi R., Miller-Graziano C., Bankey P. (2001)

Heat shock protein 27 inhibits apoptosis in human neutrophils.

J. Surg. Res. 99(1):129-33

Smolen J.E., Korchak H.M., Weissmann G. (1980)

Increased levels of cyclic adenosine-3',5'-monophosphate in human polymorphonuclear leukocytes after surface stimulation.

J. Clin. Invest. 65(5):1077-85

Smolenski A., Bachmann C., Reinhard K., Honig-Liedl P., Jarchau T., Hoschuetzky H., Walter U. (1998)

Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody.

J. Biol. Chem. 273(32):20029-35

Smolenski A., Poller W., Walter U., Lohmann S. (2000)

Regulation of Human Endothelial Cell Focal Adhesion Sites and Migration by cGMP-dependent Protein Kinase.

J. Biol. Chem. 275(33): 25723-25732

Suhasini M., Li H., Lohmann S.M., Boss G.R., Pilz R.B. (1998)

Cyclic-GMP-dependent protein kinase inhibits the Ras/Mitogen-activated protein kinase pathway.

Mol. Cell Biol. 18(12):6983-94

Thelen M., Uguccioni M., Bosiger J. (1995)

PI 3-kinase-dependent and independent chemotaxis of human neutrophil leukocytes.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 217(3):1255-62

Tilton B., Andjelkovic M., Didichenko S.A., Hemmings B.A., Thelen M. (1997)

G-Protein-coupled receptors and Fcγ-receptors mediate activation of Akt/protein kinase B in human phagocytes.

J. Biol. Chem. 272(44):28096-101

Torres M., Hall F.L., O'Neill K. (1993)

Stimulation of human neutrophils with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces tyrosine phosphorylation and activation of two distinct mitogen-activated protein-kinases.

J. Immunol. 150(4):1563-77

Tsai A.L., Hsu M.J., Vijjeswarapu H., Wu K.K. (1989)

Solubilization of prostacyclin membrane receptors from human platelets.

J. Biol. Chem. 264(1):61-7

Tse R.L., Phelps P., Urban D. (1972)

Polymorphonuclear leukocyte motility in vitro. Effect of purine and pyrimidine analogues: possible role of cyclic AMP.

J. Lab. Clin. Med. 80(2):264-74

Vinatier D., Monnier J.C. (1995)

Pre-eclampsia: physiology and immunological aspects.

Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 61(2):85-97

Waddell T. K., Fialkow L., Chan C. K., Kishimoto T. K., Downey G. P. (1995)

Signaling functions of L-selectin. Enhancement of tyrosine phosphorylation and activation of MAP kinase.

J. Biol. Chem. 270(25):15403-15411

Walcheck B., Kahn J., Fisher J. M., Wang B. B., Fisk R. S., Payan D. G., Feehan C., Betageri R., Darlak K., Spatola A. F., Kishimoto T. K. (1996)

Neutrophil rolling altered by inhibition of L-selectin shedding in vitro.

Nature 380(6576): 720-723

Waldmann R., Nieberding M., Walter U. (1987)

Vasodilator-stimulated protein phosphorylation in platelets is mediated by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases.

Eur. J. Biochem. 167(3):441-8

Walter U., Eigenthaler M., Geiger J., Reinhard M. (1993)

Role of cyclic nucleotide-dependent protein kinases and their common substrate VASP in the regulation of human platelets.

Adv. Exp. Med. Biol. 344:237-49

Webb P.R., Wang K.Q., Scheel-Toellner D., Pongracz J., Salmon M., Lord J.M. (2000)

Regulation of neutrophil apoptosis: a role for protein kinase C and phosphatidylinositol-3-kinase.

Apoptosis 5(5):451-8

Wenzel-Seifert K., Ervens J., Seifert R. (1991)

Differential inhibition and potentiation by cell-permeant analogues of cyclic AMP and cyclic GMP and NO-containing compounds of exocytosis in human neutrophils.

Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 344(4):396-402

White R.E., Kryman J.P., El-Mowafy A.M., Han G., Carrier G.O. (2000)

cAMP-dependent vasodilators cross-activate the cGMP-dependent protein kinase to stimulate BK(Ca) channel activity in coronary artery smooth muscle cells.

Circ. Res. 86(8):897-905

Widmann C., Gibson S., Jarpe M.B., Johnson G.L. (1999)

Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol.*

Rev. 79(1):143-80

Williams M. A., Solomkin J. S. (1999)

Integrin-mediated signaling in human neutrophil functioning.

J. Leukocyte Biol. 65(6):725-736

Wright C.D., Kuipers P.J., Kobylarz-Singer D., Devall L.J., Klinkefus B.A., Weishaar R.E. (1990)

Differential inhibition of human neutrophil functions. Role of cyclic AMP-specific, cyclic GMP-insensitive phosphodiesterase.

Biochem. Pharmacol. 40(4):699-707

Wu Q.D., Wang J.H., Condron C., Bouchier-Hayes D., Redmond H.P. (2001)

Human neutrophils facilitate tumor cell transendothelial migration.

Am. J. Physiol. Cell Physiol. 280(4):C814-22

Yamamori T., Inanami O., Nagahata H., Kuwabara M. (2004)

Phosphoinositide 3-kinase regulates the phosphorylation of NADPH oxidase component p47(phox) by controlling cPKC/PKCdelta but not Akt.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 316(3):720-30

Danksagung

Die vorliegende Dissertationsarbeit wurde vom November 2001 bis November 2004 im Labor für Klinische Biochemie und Pathobiochemie an der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg durchgeführt.

An erster Stelle möchte ich sehr herzlich Priv. Doz. Dr. med. Martin Eigenthaler danken, der das Thema dieser Arbeit gestellt und sie mit großem persönlichem Einsatz betreut hat. Durch sein eigenes Vorbild weckte er das Interesse an wissenschaftlichen Fragestellungen und gab seine Begeisterung für Forschung an mich weiter. Ich danke für die hohe Bereitschaft, bei Fragen und Problemen jederzeit Anregungen und Hilfestellungen zu geben. Ich danke auch für die motivierenden Ratschläge beim Verfassen der Dissertationsschrift und auch für den Freiraum und die Eigenständigkeit, die er mir bei der Gestaltung meiner Arbeit gelassen hat.

Bei Herrn Professor Dr. med. U. Walter, dem Leiter des Instituts für Klinische Biochemie und Pathobiochemie, bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferats.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Anna Kobsar, die mir im Labor mit Rat und Tat zur Seite stand. Dr. Suzanne Lohmann, Dr. Stepan Gambaryan danke ich auch für hilfreiche Unterstützung.

Bei Birgitta, Katharina, Sonja, Eva und Elfi möchte ich mich für freundschaftliche und nette Atmosphäre im Labor bedanken.

Viele haben mir geholfen mit großen und kleinen Dingen. Da ich an dieser Stelle nicht alle aufzählen kann, danke ich allen, deren Hilfe ich während meiner Arbeit im Labor und beim Zusammenschreiben dieser Arbeit erfahren durfte.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Freund Alex, die meinen Lebensweg liebevoll begleiten.