

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Studie erfaßt die funktionelle Rolle der Bradykininrezeptoren während der funktionellen Aktivierung / Deaktivierung von Peritonealmakrophagen des Meerschweinchens und deren Interaktion mit Interleukin-1 und Prostaglandin E₂ in Abhängigkeit von dem jeweiligen Aktivierungszustand. Weiterhin wurde die zelluläre Aktivität von Bradykinin mit fMLP verglichen, um auf allgemeine Regelmechanismen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren schließen zu können.

Zunächst wurden die in Zellgröße und Reifungsgrad variierenden Makrophagen mit Hilfe der Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgetrennt. Anhand der Produktion und Freisetzung von Sauerstoffradikalen nach Stimulation mit Bradykinin und fMLP konnte im Rahmen der Makrophagen-Aktivierung eine Verstärkung der O₂⁻-Freisetzung beobachtet werden, die während der Makrophagen-Deaktivierung wieder abnahm.

Mit dem Cyclooxygenase-Inhibitor Indomethacin wurde der Aktivierungs- bzw. Deaktivierungsprozeß näher charakterisiert. In Abhängigkeit vom Aktivierungszustand und von der aktivierenden Substanz wurden unterschiedliche Effekte durch Indomethacin erreicht. Die Verstärkung der durch Bradykinin und fMLP induzierten O₂⁻-Freisetzung wurde durch Indomethacin gehemmt und belegte die proinflammatorischen Eigenschaften von Prostaglandin E₂. Die deaktivierende Wirkung von PGE₂ auf die zelluläre Aktivität von Bradykinin wurde durch Indomethacin aufgehoben, was die Rolle von PGE₂ als *negatives feedback*-Signal zur Verhinderung überschießender zytotoxischer Aktivität belegte. Die deaktivierende Wirkung von PGE₂ auf die zelluläre Aktivität von fMLP wurde dagegen durch Indomethacin noch stärker gehemmt und ließ auf unterschiedliche Signaltransduktionswege schließen, die zur Aktivierung der NADPH-Oxidase führen.

Mit Bindungsstudien wurde gezeigt, daß *in vivo* der Bradykinin-B₂-Rezeptor während der funktionellen Aktivierung verstärkt exprimiert wird. Dieses Ergebnis wurde mit Hilfe der Western Blot-Analyse mit dem Anti-B₂-Bradykinin-Rezeptor bestätigt. Die Änderung des K_d-Wertes während der Makrophagen-Aktivierung im Mittel von 1,7 nM (n = 4) auf 7,1 nM (n = 2) korrelierte mit der Änderung der EC₅₀ der funktionellen Reaktion und läßt eine Änderung der Bindungsaffinität vermuten.

Die unter *ex vivo in vitro* Bedingungen beobachteten Veränderungen an unterschiedlich aktivierten Makrophagen konnten *in vitro* mit dem Entzündungsmediator Interleukin-1 β reproduziert werden. IL-1 β war sowohl als proinflammatorisches Zytokin in der Lage bei responsiven Zellen die durch Bradykinin und fMLP induzierte Sauerstoffradikalfreisetzung zu verstärken als auch bei aktivierten Makrophagen, den deaktivierenden Effekt in Form einer reduzierten O $_2^{\cdot-}$ -Freisetzung auszulösen. Die Wirkung von IL-1 β auf die unterschiedlichen Peptidhormone an Makrophagen scheint identisch zu sein, nur die Stärke des Effektes alterierte mit dem jeweiligen Peptid.

Der Einfluß von IL-1 β auf die funktionellen Reaktionen korrelierte mit den Alterationen der durch Bradykinin und fMLP stimulierten Freisetzung von intrazellulären Ca $^{2+}$ -Ionen. Die Messungen im calciumfreien Medium wurden ebenfalls durch IL-1 β beeinflußt und ließen vermuten, daß die Interaktion von IL-1 β mit Bradykinin bzw. fMLP auf Rezeptorebene stattfindet. Bindungsstudien mit IL-1 β belegten an responsiven Makrophagen eine Zunahme der Zahl der spezifischen Bindungen für Bradykinin, die eine Wechselwirkung auf Rezeptorebene mutmaßen lassen. Zusätzliche Interaktionen, die in Form eines *cross talks* auf Signaltransduktionsebene ablaufen, lassen sich aber nicht vollständig ausschließen.

Da PGE $_2$ ähnlich dem IL-1 β in der Lage ist, die Makrophagen-Aktivierung / -Deaktivierung zu beeinflussen, wurde im letzten Abschnitt dieser Arbeit der wechselseitige Einfluß dieser Entzündungsmediatoren auf die fMLP- und Bradykininantwort untersucht.

Die *in vitro* Kultivierung von Makrophagen mit Interleukin-1 β und IL-1 β und Indomethacin in Kombination ergab, daß sowohl der proinflammatorische Effekt von IL-1 β durch PGE $_2$ aufgehoben wurde als auch die deaktivierende Wirkung.

Die Resultate dieser Studie zeigen, daß ein komplexes Wechselspiel verschiedener Entzündungsmediatoren wie IL-1, Eicosanoide und auch Bradykinin an unterschiedlich aktivierten Makrophagen für das Nettoverhalten der Immunzellen verantwortlich ist. Die genaue Kenntnis über diese Interaktionen ist eine wichtige Voraussetzung, um bei verschiedenen Entzündungsprozessen therapeutische Ansätze zu finden.

7 Summary

Karen Mohrdieck

Function of the bradykinin receptor in peritoneal guinea pig macrophages and effect of Interleukin-1 and prostaglandin E_2 on the bradykinin response in comparison to the N-formylmethionylleucylphenylalanine receptor

The aim of the study was to investigate the regulation of the bradykinin receptor on guinea pig macrophages during different stages of activation and the effect of interleukin-1 and prostaglandin E_2 on the bradykinin response. The effects of the bradykinin receptor were compared with fMLP. Both peptides belong to the superfamily of the G protein-coupled receptors.

The heterogenous population of macrophages was separated according to their actual cell size and stage of maturation by centrifugation on discontinuous gradients of Percoll. The comparison of the various fractions of macrophages resulted in differences of functional activity. Cell activation was associated with increasing superoxide anion release in response to bradykinin and fMLP which was decreasing by fully activated macrophages.

The cyclooxygenase inhibitor indomethacin was used to receive a detailed characterization of the activation and deactivation process of macrophages. Depending on the activating stage and the stimulating peptide different effects were observed. The enhancement of superoxid anion release in response to bradykinin and fMLP during macrophage activation was inhibited by indomethacin and proved the proinflammatory properties of prostaglandin E_2 . The decreasing superoxid anion release in response to bradykinin by fully activated macrophages was removed by preincubation with indomethacin. This result demonstrated the role of PGE_2 to prevent the release of large amounts of superoxid anions in form of a *negative feedback* signal. In contrary to this observation the decreasing superoxid anion release responding to fMLP by fully activated macrophages was inhibited by indomethacin. This result suggested different signaltransduction pathways for activating the NADPH oxidase by fMLP and bradykinin.

Binding studies demonstrated that activation of the macrophages is associated with induction of the bradykinin B₂-receptor. This result was confirmed by the western blot analysis with the anti-B₂ bradykinin-receptor antibody. Scatchard analysis revealed a binding site with an average K_d of 7.1 nM (n = 2) on responsive macrophages. Cell activation caused the binding site to an average K_d of 1.7 nM (n = 4) on primed macrophages. The conversion of the affinity value correlated with the conversion of the EC₅₀ value of the functional response.

This *in vivo* alterations on macrophages during different stages of activation could be reproduced *in vitro* with the inflammatory cytokine interleukin-1. IL-1β induced an enhancement of superoxid anion release in response to bradykinin and fMLP on responsive macrophages. Pretreatment of primed macrophages with IL-1β resulted in a decreasing superoxid anion release. The effect of IL-1β on the functional response of G protein-coupled receptors seems to be identical - only the magnitude varies with the stimulus.

The effect of IL-1β on the functional response to bradykinin and fMLP correlated with agonist-induced alterations in [Ca²⁺]_i. Measuring in nominally Ca²⁺-free buffer proved a receptor mediated elevation in [Ca²⁺]_i in response to bradykinin and fMLP.

Binding studies demonstrated that pretreatment of responsive macrophages with IL-1β was associated with an upregulation of the bradykinin B₂-receptor. These data confirm the hypothesis that the main effect of interleukin-1 on the bradykinin and fMLP responsiveness is at the receptor level. Additional cross talks on the signaltransduction pathways could be possible.

The last part of this study clarified the interactions of interleukin-1 and prostaglandin E₂ on the bradykinin and fMLP response during different stages of activation with regard to their regulatory functions. Pretreatment with IL-1β and IL-1β and indomethacin in combination demonstrated that PGE₂ compensated the increasing as well as the decreasing effects of IL-1β on the responsiveness to bradykinin and fMLP.

In summary the results of this investigation indicate that the complex interactions of interleukin-1, eicosanoids, and bradykinin contribute to the regulation of macrophage function. Knowledge about these regulatory mechanisms is a necessary requirement for therapeutic intervention in inflammation.