

中國醫藥大學藥學院  
藥物化學研究所碩士論文

指導教授：郭盛助 教授

共同指導教授：王繼平 教授

化合物 TCH 抑制 fMLP 刺激大鼠嗜中性白血球生成

超氧自由基的研究

**Inhibition of superoxide anion generation by TCH  
in rat neutrophils**

研究生：蔡雅如

**(Ya-Ru Tsai)**

中 華 民 國 九 十 九 年 一 月

## 誌謝

首先要感謝家人的支持和指導老師郭盛助、黃麗嬌、王繼平教授的教誨，使我的畢業論文能趨於完善。在求學過程中，不僅僅是在實驗技巧上的鑽研，更重要的是學習如何解決問題和增強邏輯思考能力，在這短短兩年半中，的確使我進步成長許多。

還要感謝實驗室的好伙伴，首先最最感謝菊子學姐，在實驗上的指點迷津；秉文學長在各方面的建議和指教；韻潔學姐、依瑩和洪喬在實驗室的幫忙，多虧有了大家的協助，使我的論文能夠順利完成。最重要的是，有佩宜學姐、薰儀學姐、婷翔、佩珊、峰哥和小鵲等好朋友的支持與鼓勵，陪我度過低潮。



## 中文摘要

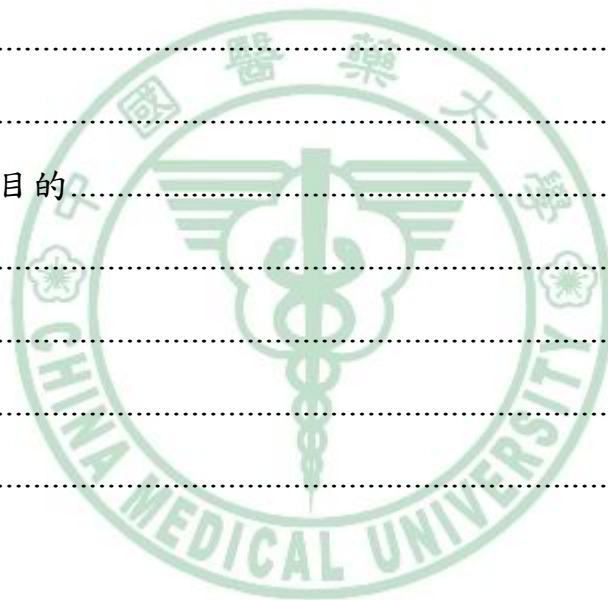
新合成 phenazine carboxylate 類的化合物 TCH 可以濃度依存性但並無明顯的時間依存性的抑制 formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) 所誘導嗜中性白血球超氧自由基的生成( $IC_{50}$  值為  $4.5 \pm 0.8 \mu M$ )。此抑制作用並非來自於影響細胞存活、超氧自由基清除或直接抑制 NADPH oxidase 的活性。在相同的  $IC_{50}$  值下 TCH 抑制嗜中性白血球細胞中  $p47^{phox}$  和  $p22^{phox}$  的連結、Rac2 和  $gp91^{phox}$  的連結、 $p47^{phox}$ 、p21-activated kinase 1 (PAK1) 及 Vav 的磷酸化。TCH 並不影響 p38 mitogen-activated protein kinase 與 MAPK-activated protein kinase-2 的磷酸化。TCH 可抑制細胞中 Akt 與  $p47^{phox}$  的連結、Akt 的磷酸化及 Akt 酵素活性，但不抑制細胞溶解液中的 Akt 酵素活性。TCH 可抑制 active human recombinant PDK1 酵素活性，但不影響 Akt 與 PDK1 的細胞膜轉移。TCH 會抑制 PKC- $\alpha$ 、 $\delta$ 與 $\zeta$  和  $p47^{phox}$  的連結作用，但不影響 PKC- $\beta$  和  $p47^{phox}$  的連結。TCH 會抑制 PKC- $\alpha$ ，但不會抑制 PKC- $\beta$ 、 $\delta$ 與 $\zeta$ 的細胞膜轉移。TCH 也不會抑制 fMLP 刺激細胞引起的 PKC 活性。TCH 不會增加細胞內 cyclic AMP 的含量。綜合以上結果，TCH 可能經由影響 PDK1/Akt、PKC 和 PAK1 訊息傳遞途徑來抑制  $p47^{phox}$  的磷酸化，經由影響 Vav/Rac2 訊息傳遞途徑來抑制 Rac2 的活化，進而抑制 NADPH oxidase 聚合及超氧自由基的生成。

## Abstract

A novel synthetic phenazine carboxylate derivative TCH inhibited formyl-Met-Leu-Phe (fMLP)-stimulated superoxide anion generation in rat neutrophils in a concentration- but not a time-dependent manner with  $IC_{50}$  value about  $4.5 \pm 0.8 \mu\text{M}$ . This inhibitory effect was not owing to the decrease in cell viability, scavenging of generated superoxide anion or direct blockade of NADPH oxidase activity. Under the same  $IC_{50}$  value, TCH inhibited the interaction of  $p47^{phox}$  and Rac2 with  $p22^{phox}$  and  $gp91^{phox}$ , respectively, and the phosphorylation of  $p47^{phox}$ , p21-activated kinase 1 (PAK1) and Vav in fMLP-stimulated cells. TCH had no effect on the phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase and MAPK-activated protein kinase-2. Pretreatment of cells with TCH inhibited the interaction of Akt with  $p47^{phox}$ , the phosphorylation of Akt and Akt activity, whereas, it did not affect the Akt activity in the cell-lysates of fMLP-stimulated cells. TCH inhibited the enzymatic activity of active human recombinant PDK1, whereas, it had no effect on the recruitment of Akt and PDK1 to membrane. TCH attenuated the interaction of PKC- $\alpha$ , - $\delta$  and - $\zeta$  with  $p47^{phox}$ , whereas, it did not affect the association of PKC- $\beta$  with  $p47^{phox}$ . TCH decreased the membrane recruitment of PKC- $\alpha$  but not of PKC- $\beta$ , - $\delta$  and - $\zeta$ . TCH had neither block the PKC activity nor increase the cellular cyclic AMP levels of fMLP-stimulated cells. Taken together, TCH probably attenuate PDK1/Akt, PKC and PAK1 signalings and Vav pathway leading to the inhibition of  $p47^{phox}$  phosphorylation and Rac2 activation, respectively, which in turn blockade the assembly of active NADPH oxidase and then superoxide anion generation.

## 目錄

誌謝.....	iv
中文摘要.....	ivi
英文摘要.....	iii
目錄.....	ivii
圖目錄.....	v
縮寫表.....	vii
第一章 緒論.....	1
第二章 研究動機與目的.....	24
第三章 實驗部分.....	25
第四章 結果與討論.....	34
第五章 結論.....	61
參考文獻.....	62



## 圖目錄

圖 1-1	PMN 在不同時期顆粒球分泌的物質	14
圖 1-2	NADPH oxidase 組成結構	15
圖 1-3	Cytochrome $b_{558}$ 的結構	16
圖 1-4	FPR 在化學刺激物下的訊息傳遞路徑	17
圖 1-5	PI3K class IA 和 IB 的結構	18
圖 1-6	Akt 的結構	19
圖 1-7	Akt 活化機制	20
圖 1-8	PAK 的種類和基本結構	21
圖 1-9	PAK 基本結構和活化過程	22
圖 1-10	MAPK 的活化路徑	23
圖 2-1	TCH 抑制嗜中性白血球產生超氧自由基的濃度依存性	41
圖 2-2	TCH 抑制嗜中性白血球產生超氧自由基的時間依存性	42
圖 2-3	TCH 對細胞存活率的影響	43
圖 2-4	TCH 對超氧自由基的清除作用	44
圖 2-5	TCH 對 xanthine-xanthine oxidase 產生超氧自由基的影響	45
圖 2-6	TCH 抑制 fMLP 刺激細胞產生超氧自由基之可逆性	46
圖 2-7	TCH 對 cell-free 系統 NADPH oxidase 活性的影響	47
圖 2-8	TCH 對 fMLP 誘導 $p47^{phox}$ 活化之影響	48
圖 2-9	TCH 對 fMLP 誘導 Rac2 活化之影響	49
圖 2-10	fMLP 誘導 Akt 和 PDK1 細胞膜轉位的作用	50
圖 2-11	TCH 對 Akt 磷酸化、細胞膜轉位及與 $p47^{phox}$ 連結的影響	51

圖 2-12	TCH 對 Akt 活化的影響.....	52
圖 2-13	TCH 對 PDK1 活化的影響.....	53
圖 2-14	6BIO 對嗜中性白血球產生超氧自由基、Akt 和 PDK1 活化的影響	54
圖 2-15	TCH 對 PKC 活化的影響.....	55
圖 2-16	TCH 對 p38 MAPK、MK2 磷酸化的影響.....	56
圖 2-17	TCH 對 PAK 磷酸化的影響.....	57
圖 2-18	TCH 對 Vav 磷酸化的影響.....	58
圖 2-19	TCH 對 cyclic AMP 生成的影響.....	59
圖 2-20	結論.....	60



## 縮寫表

6BIO	(2'Z,3'E)-6-bromoindirubin-3'-oxime
AA	arachidonic acid
Akt	protein kinase B
aPKC	atypical PKC
ARF	ADP-ribosylation factor
CB	cytochalasin B
cPKC	classical or conventional protein kinase C
DAG	diacylglycerol
DHF	dihydroxyfumaric acid
DMSO	dimethyl sulphoxide
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FAD	flavin adenine dinucleotide
FDA	fluorescein diacetate
fMLP	formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
FPR	formyl-peptide receptor
FPRL	fMLP receptor-like
GAP	GTPase-activating protein
GDI	guanine nucleotide dissociation inhibitor
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GPCR	G-protein-coupled receptor
HBSS	Hanks' balanced salt solution
IP <sub>3</sub>	inositol 1,4,5-trisphosphate
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LY 294002	(4- morpholinyl)-8-phenyl-4 <i>H</i> -1-benzopyran-4-one



MAPK .....	mitogen-activated protein kinase
MAPKAPK2/MK-2 .....	MAPK-activated protein kinase-2
MKK/MEK .....	MAPK kinase
MKKK/MEKK .....	MAPK kinase kinase
NADPH .....	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NBT .....	nitroblue tetrazolium
nPKC .....	novel PKC
PA .....	phosphatidic acid
PAK .....	p21-activated kinase
PB1 .....	Phox and Bem1
PBD .....	p21-binding domain
PDK .....	3-phosphoinositide-dependent protein kinase
PH .....	Pleckstrin-homology
PI3K .....	phosphoinositide 3-kinase
PI(3)P .....	phosphatidylinositol 3-phosphate
PI(3,4)P <sub>2</sub> .....	phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate
PI(4,5)P <sub>2</sub> .....	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PI(3,4,5)P <sub>3</sub> .....	phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
PKA.....	protein kinase A
PKC .....	protein kinase C
PLA <sub>2</sub> .....	phospholipase A <sub>2</sub>
PLC .....	phospholipase C
PLD .....	phospholipase D
PMA .....	phorbol 12-myristate 13-acetate
PRR .....	proline-rich region
PS .....	phosphatidylserine
PVDF .....	polyvinylidene difluoride

PX ..... Phox homology  
SB 203580 .....4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4  
-pyridyl)-1*H*-imidazole  
SDS-PAGE ..... sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis  
SH2 ..... Src homology 2  
SH3 ..... Src homology 3  
SOD ..... superoxide dismutase  
TPR ..... tetratricopeptide repeat



## 第一章 緒論

### 嗜中性白血球在免疫上扮演的角色

人體對於微生物的攻擊所產生的保護性反應很類似軍事上的防禦。皮膚為抵禦外敵入侵的第一防線，但病原菌若因皮膚受損或以其他路徑進入體內，則駐紮在該處的防衛隊(吞噬細胞)必須立刻啟動防衛機制，此為先天性免疫系統 (innate immune system)。

多形核白血球 (polymorphonuclear leukocytes) 為先天性免疫系統的成員，包括嗜中性白血球、嗜酸性白血球和嗜鹼性白血球。其中嗜中性白血球約佔循環白血球數的50-60%，細胞直徑約11-14  $\mu\text{m}$ ，缺乏粒腺體，核為多葉，細胞質富含顆粒 (granules)，在血液循環中只存活約7-10小時，為人體主要的噬菌系統。當人體受到感染時，嗜中性白血球的數目會上升，並受到發炎物質如 chemokines 或 cytokines 的刺激，進行趨化作用 (chemotaxis) 到達患部。趨化作用的過程裡，血液循環中的嗜中性白血球先向血管壁靠近，沿著內皮細胞滾動 (rolling)，透過 selectin 與內皮細胞連接，進而附著 (adhesion) 在內皮細胞上，再由內皮細胞間隙滲出 (transmigration) 離開血管向著患部移動 (migration) (圖1-1)。隨後，嗜中性白血球對病原菌進行吞噬作用 (phagocytosis)，形成 phagosome，同時伴隨著去顆粒化作用 (degranulation)，而 phagosome 會與分泌顆粒融合形成 phagolysosome，以殺死並分解細菌 (Segal, 2005)。

嗜中性白血球的殺菌作用分為兩類，一為非氧化性 (non-oxidative)，二為氧化性 (oxidative) 機制。非氧化性機制是利用分泌顆粒中多種酵素及殺菌蛋白來進行殺菌，包括初級顆粒 (primary/azurophilic granules) 中的 lysozyme、 $\beta$ -glycerolphosphatase、bactericidal/permeability-increasing protein (BPI)、elastase、

cathepsin G、protease 3、azurocidin、myeloperoxidase 等；次級顆粒 (secondary/specific granules) 中的 lactoferrin、lipocalin、lysozyme、LL37、MMP8、MMP9 和 MMP25；三級顆粒 (tertiary/gelatinase granules) 中的 lysozyme、gelatinase、acetyltransferase 等 (Nathan, 2006)。Chediak-Higashi syndrome 和 specific granule deficiency 為兩種罕見的遺傳疾病，因缺乏非氧化性機制造成白血球功能的異常，導致病患容易造成較嚴重的感染。第二種殺菌作用，為氧化性機制是嗜中性白血球活化膜上的 NADPH oxidase，此過程迅速消耗大量的氧分子還原成超氧自由基 (superoxide anion)，稱為呼吸爆發作用 (respiratory burst)。超氧自由基會代謝成 $H_2O_2$ 、 $HO\cdot$ 和 $HOCl$ 等產物，合稱為活性氧物質 (reactive oxygen species, ROS)。ROS會和細胞內的核酸、蛋白質、脂肪和醣類等作用，造成結構和生理功能的改變。慢性肉芽腫病 (chronic granulomatous disease, CGD)是一種CYBB基因突變因，NADPH oxidase異常無法正常生成超氧自由基，導致病患容易造成較嚴重的感染。約70%患者為  $gp91^{phox}$  缺陷，25%是  $p47^{phox}$  的缺陷。但是NADPH oxidase過度活化也會造成正常組織器官的損傷，如動脈粥狀硬化 (atherosclerosis) 好發於慢性發炎反應。類風濕性關節炎 (rheumatoid arthritis)在關節部分發現大量嗜中性白血球和巨噬細胞的聚集，因NADPH oxidase過度活化造成關節傷害 (El-Benna et al., 2009)。

## NADPH oxidase

NADPH oxidase 為蛋白質複合物，包括在細胞膜上的cytochrome  $b_{558}$  (由  $gp91^{phox}/NOX2$  及  $p22^{phox}$  組成) 和存在細胞質中的  $p47^{phox}$ 、 $p67^{phox}$ 、 $p40^{phox}$  和 small G protein Rac (Babior et al., 2002)。在細胞進行吞噬作用的同時也活化了NADPH oxidase，使細胞質中的  $p47^{phox}$ 、 $p67^{phox}$ 、 $p40^{phox}$  及 Rac 轉移到膜上，與 cytochrome  $b_{558}$  結合形成完整具酵素活性的 NADPH oxidase。經由 NADPH

oxidase 的穿膜電子傳遞鏈 (transmembrane electron transport chain) ( $\text{NADPH} \rightarrow \text{FAD} \rightarrow 2 \text{ heme} \rightarrow \text{O}_2$ )，由 NADPH 提供電子來開啟反應，最後將氧分子還原成超氧自由基 ( $\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{NADP}^+ + 2\text{O}_2^- + \text{H}^+$ ) (圖1-2) (Takeya and Sumimoto, 2003)。

NADPH oxidase 催化作用的核心是醣蛋白  $\text{gp91}^{\text{phox}}$ ，存在嗜中性白血球細胞膜和分泌顆粒的膜上。 $\text{gp91}^{\text{phox}}$  的 N-terminal 有六個穿膜的  $\alpha$ -helices，且第三和第五的 helices 間有兩個 hemes，heme 以鐵離子與 His 殘基連接；而在細胞質中的 C-terminal 為 ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase (FNR) 可與 NADPH 和 FAD 結合(圖1-3) (Hideki, 2008)。另外，有文獻指出若阻斷  $\text{gp91}^{\text{phox}}$  的 C-terminal 後並不影響 NADPH oxidase 與其他蛋白質的結合，但降低 NADPH oxidase 的活性 (Burritt et al., 2003)。

$\text{p22}^{\text{phox}}$  在 C-terminal 包含 proline-rich region (PRR) 與  $\text{p47}^{\text{phox}}$  的 Src homology 3 (SH3) domains 結合。另外， $\text{p22}^{\text{phox}}$  的 PRR 有一段 polyproline II (PPII) helix，其氨基酸序列上的 Pro152、Pro156 和 Arg158 與  $\text{p47}^{\text{phox}}$  的結合有很重要的關係 (Nobuhisa et al., 2006)。而在 cell-free system 中， $\text{p22}^{\text{phox}}$  可經由 phosphatidic acid (PA) 依存性的方式進行磷酸化，進而活化 NADPH oxidase (Regier et al., 1999)。

$\text{p47}^{\text{phox}}$  或稱 neutrophil cytosolic factor 1 (NCF1) 由 390 個氨基酸構成，其結構上包含有 N-terminal 的 phox homology (PX) domain、兩個 SH3 domains、autoinhibitory region (AIR) 和 C-terminal 的 PRR。 $\text{p47}^{\text{phox}}$  在非活化狀態下，經由 AIR 將兩個 SH3 domain 的活性部位遮蔽起來；而 SH3 domain 將 PX domain 活性部位遮蔽起來 (Hiroaki et al., 2001)。當細胞受到刺激時，AIR 可經由多處 Ser 的磷酸化 (S303、S304、S359、S370) 改變了  $\text{p47}^{\text{phox}}$  的構形，使 SH3 domain 暴露出來與膜上  $\text{p22}^{\text{phox}}$  的 PRR 結合 (El Benna et al., 1994; Inanami et al., 1998; Johnson et al., 1998)；而  $\text{p47}^{\text{phox}}$  的 PRR 則與  $\text{p67}^{\text{phox}}$  的 SH3 domain

結合 (Sumimoto et al., 2005)。另外，在 AIR 磷酸化的同時，低濃度的 AA (1-5  $\mu\text{M}$ ) 可以幫忙  $p47^{\text{phox}}$  將 PX domain 暴露出來，具有更好的活性。在 cell-free system 或完整的細胞中，高濃度的 AA (50-100  $\mu\text{M}$ ) 可直接使  $p47^{\text{phox}}$  與  $p22^{\text{phox}}$  完整地結合進而活化 NADPH oxidase (Shiose et al., 2000)。PX domain 可與位在膜上的 phosphoinositides (PI(3,4)P<sub>2</sub>) 或 phospholipids (PA、phosphatidylserine (PS)) 結合 (Karathanassis et al., 2002; Stahelin et al., 2003)。另外，在 formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) 或 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 刺激下，許多蛋白質激酶 (protein kinase) 會對  $p47^{\text{phox}}$  磷酸化，包括 p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 和 extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)，還有 protein kinase B (PKB/Akt)、protein kinase C (PKC)、p21-activated kinase (PAK) 等都會增強 NADPH oxidase 的活性 (El-Benna et al., 2009)。相反的，protein kinase A (PKA) 和 casein kinase II 對  $p47^{\text{phox}}$  磷酸化則有可能造成其活性下降 (Bengis-Garber et al., 1996; Park et al., 2001)。

$p67^{\text{phox}}$  (NOX activator) 由 526 個氨基酸構成，其結構上的 N-terminal 具有四個 tetratricopeptide repeat (TPR) motifs，而 C-terminal 有兩個 SH3 domains 和介於 SH3 domain 間的 Phox and Bem1 (PB1) domain。TPR motifs 可與 Rac 結合，PB1 domain 則會辨識  $p40^{\text{phox}}$  的 PB1 domain (Sumimoto et al., 2005)，而靠近 C-terminal 的 SH3 domain 則與  $p47^{\text{phox}}$  的 PRR 連結。所以 Rac 存在下，可促進  $p67^{\text{phox}}$  和  $gp91^{\text{phox}}$  的結合。 $p67^{\text{phox}}$  也參與 NADPH 所提供的電子傳給氧分子。有研究指出，當細胞缺乏 cytochrome  $b_{558}$  時， $p47^{\text{phox}}$  和  $p67^{\text{phox}}$  便無法轉移至膜上。而  $p67^{\text{phox}}$  在沒有  $p47^{\text{phox}}$  時也無法轉移到膜上。但  $p47^{\text{phox}}$  在沒有  $p67^{\text{phox}}$  仍然可以轉移到膜上。可能是  $p47^{\text{phox}}$  活化後產生  $p67^{\text{phox}}$  的結合位置，使  $p67^{\text{phox}}$  轉移至膜上 (Roos et al., 2003)。

$p40^{\text{phox}}$  由 339 個氨基酸構成，其結構在 N-terminal 有 PX domain 和 SH3 domain，而在 C-terminal 有 PB1 domain。 $p40^{\text{phox}}$  的功能為促進  $p47^{\text{phox}}$  和

p67<sup>phox</sup> 在膜上的結合 (Kuribayashi et al., 2002) 。p40<sup>phox</sup> 的 PX domain 可與膜上的 PI(3)P 結合，因此 p67<sup>phox</sup> 便能藉此與細胞膜連接 (Ellson et al., 2001) 。但目前對 p40<sup>phox</sup> 功能的了解仍然有限。有些學者認為 p40<sup>phox</sup> 會活化 NADPH oxidase，但也有些學者認為 p40<sup>phox</sup> 會抑制 NADPH oxidase (Sathyamoorthy et al., 1997) 。

Rac (21 kDa) 是 Rho-family small GTPase 的成員，包含三種 isoforms (Rac1、Rac2和Rac3) 。Rac2 主要表現在嗜中性白血球，而 Rac1 主要表現在巨噬細胞。Rac2 在活化的過程中為獨立的，並不受 p47<sup>phox</sup> 或 p67<sup>phox</sup> 的影響，並將 C-terminal的 Cys189 上 geranylgeranylation 以便與細胞膜結合。未活化態的 Rac-GDP 存在細胞質中，且與 guanine nucleotide dissociation inhibitors (GDIs) 結合，抑制 GDP 和 GTP 的交換。當細胞受刺激活化時，Rac-GDP 與 GDI 分開，並在 P-Rex1 (185 kDa) 的調節下，GDP 交換 GTP 而成活化態，並轉移到膜上與 cytochrome b<sub>558</sub> 和 p67<sup>phox</sup> 的 TPR 結合，最後活化 NADPH oxidase (Chuang et al., 1993 ; Bokoch, 1994 ; Koga et al., 1999 ; Sarfstein et al., 2004) 。而 P-Rex1 為 guanine nucleotide exchange factors (GEFs)，可受到 phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP<sub>3</sub>) 和 G<sub>βγ</sub> subunits 的調節。

### **NADPH oxidase活化的細胞訊息傳遞路徑**

已知 formylpeptide receptors (FPR)接受刺激後，會經由 phosphoinositide 3-kinase (PI3K)和 phospholipase C (PLC)、PAK、PKC、Rac和MAPK (Montserrat et al., 1992; Stoyanov et al., 1995)訊息傳遞途徑來活化NADPH oxidase (圖1-4)。

### **FPR**

FPR為 G protein-coupled receptor (GPCR) 與 chemoattractant 結合，會使其構形發生變化，並可促使  $G_{i\alpha}$  的 GTP 與 GDP 交換，造成  $G_{\beta\gamma}$  subunits 與  $G_{i\alpha}$  subunit 分離。當  $G_{i\alpha}$ -GTP 的 GTP 被水解為 GDP，可和  $G_{\beta\gamma}$  subunit 再結合回到不活化態 (Simon et al., 1991)。表現在人類嗜中性白血球的有 FPR 和 FPRL1 (FPR-like 1) 兩種，且 FPR 對 fMLP 的親合度較佳。fMLP 刺激細胞所產生的生物功能，包括趨化作用、去顆粒作用和超氧自由基生成。

## PI3K

PI3K 為一種 lipid kinase 主要對 phosphoinositide 結構上 inositol 的 3'-OH 進行磷酸化。依受質的不同可分三類：class I (IA、IB)、II 和 III。PI3K 都具有 C2 domain 和 catalytic domain，且都經由 helical domain (PIK domain) 連接。Class I 可作用於 phosphatidylinositol (PI)、phosphatidylinositol 4-phosphate (PI(4)P) 和 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>)；class II 可作用於 PI 和 PI(4)P；class III 可作用於 PI (Koyasu, 2003)。

Class IA PI3K 由 adaptor subunit 和 catalytic subunit 複合體形成的 heterodimer。其中 catalytic subunit 有  $p110\alpha$ 、 $\beta$  和  $\delta$  三種。 $p110\alpha$  和  $\beta$  分佈較廣，而  $p110\delta$  主要表現在白血球。而 adaptor subunit 有  $p85\alpha$ 、 $p85\beta$ 、 $p55\alpha$ 、 $p55\gamma$  和  $p50\alpha$  五種。其中  $p85\alpha$ 、 $p85\beta$  皆具有二個 SH2 domain 可與  $p110$  的 N-terminal region 連接，以維持  $p110$  的穩定(圖 1-5)。SH2 domain 可與 phospho-tyrosine 結合，在 tyrosine kinase 活化時可促進  $p110$  聚集到膜上，造成  $p110$  的活化 (Wymann and Pirola, 1998)。Class IB PI3K 只有一種，由  $p110\gamma$  catalytic subunit 和  $p101$  adaptor subunit 形成 heterodimer。Class IB 只存在哺乳動物，主要表現在白血球中。Class IB 主要受到 GPCR 所調節， $G_{\beta\gamma}$  作用到  $p101$  並活化  $p110\gamma$  (Furman et al., 1998; Vanhaesebroek and Waterfield, 1999)。Class IA 或 IB 皆具有 Ras-binding domain，因此活化態的



Ras-GTP 也會活化 Class I<sub>A</sub> 或 I<sub>B</sub>(圖1-5)。Class II 及 class III 的活化機轉尚未完全釐清 (Koyasu, 2003)。

活化 PI3K 生成的 PI(3,4)P<sub>2</sub> 或 PI(3,4,5)P<sub>3</sub>，會誘使下游蛋白激酶 phosphoinositide-dependent kinase (PDK) 和 Akt 利用其結構上的 PH domain 與之結合，由細胞質中轉移至細胞膜上，方便 PDK 對 Akt 的磷酸化作用 (Vanhaesebroeck and Alessi, 2000; Koyasu, 2003) (圖1-7)。此外，G<sub>βγ</sub> 亦可經由促進 Shc adaptor protein 的活化及與 growth-factor-receptor-bound protein 3 (Grb3)、Sos 形成複合物去活化 Ras，進而活化 p85 (Koyasu, 2003; Wymann, 2003)。PI(3,4,5)P<sub>3</sub> 和 PI(3,4)P<sub>2</sub>，也可分別與 p40<sup>phox</sup> 和 p47<sup>phox</sup> 的 PX domain 結合 (Kanai et al., 2001)。PI3K 與 Akt 可藉由影響 actin polymerization 調控嗜中性白血球的趨化作用 (Inoue and Meyer, 2008)。

PDK (63 kD) 為 serine/threonine kinase，有 PDK1 和 PDK2 兩種。PDK1 在結構上 N-terminal 有 catalytic domain，C-terminal 有 PH domain，可對 Akt1 的 Thr308 磷酸化並活化 Akt1 (Alessi et al., 1997)。有研究指出，人類的 PDK1 在 Ser241 的磷酸化會促進其活性 (Casamayor et al., 1999)。

Akt (57-60 kDa) 亦為 serine/threonine kinase。Akt 參與細胞生長、存活和轉錄因子調控。Akt 有三種 isoforms 即 PKB $\alpha$ /Akt1、PKB $\beta$ /Akt2 和 PKB $\gamma$ /Akt3 (圖 1-6)。Akt 的 N-terminal 有 PH domain，中間為 kinase domain (又稱 activation loop)，C-terminal 則是 regulatory domain (又稱 hydrophobic motif, HM)。Akt1 的活化，包含由 PDK1 對 kinase domain 上的 Thr308 進行磷酸化，而 PDK2 則會對 HM 上的 Ser473 進行磷酸化 (Toker and Newton, 2000)。至於 PDK2 為何，至今仍眾說紛紜。有文獻指出，嗜中性白血球的 PDK2 可能是 MAPK-activated protein kinase-2 (MAPKAPK2 或 MK2)。另外，有學者提出三種方式會對 Ser473 磷酸化：(1) PDK1 (2) PDK2 (3) Akt 自體磷酸化 (Rane et al., 2001)。且 Akt 可直接磷酸化 p47<sup>phox</sup> 而參與 NADPH oxidase 的活化 (Chen et al., 2003)。

## PAK

PAK為serine/threonine kinase，根據蛋白結構與活性調節方式可分為二個族群：第一類包括PAK1、PAK2和PAK3，而第二類為PAK4、PAK5和PAK6 (圖1-8)。第一類 PAK的N-terminal 有p21-binding domain (PBD) (又稱Cdc42/Rac-interacting binding domain 或CRIB) 和autoinhibitory domain (AID)為重疊部分，PBD可與活化態的Rac和Cdc42 GTPase結合 (Manser et al., 1995; Knaus et al., 1998; Mira et al., 2000; Jaffer and Chernoff, 2002)。第一類 PAK的N端含有2個 SH3-binding motif 和1個非典型的 SH3-binding site，此2個 SH3-binding site 可與 Nck 和 Grb2 結合，非典型 SH3-binding site 則可與 Pak-interacting exchange factor (PIX) 結合 (Bokoch et al., 1996; Manser et al., 1998; Puto et al., 2003)。第一類 PAK的C-terminal有 catalytic domain可對下游 p47<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup>蛋白分子進行磷酸化作用 (Ahmed et al., 1998; Martyn et al., 2005)。第二類 PAK 則缺乏N-terminal的 AID和 SH3-binding site，所以其活性調控的方式與第一類 PAK不相同。第二類 PAK可與Cdc42結合，但是不與Rac結合，且與GTPase結合後並不會增加其活性 (Abo et al., 1998; Cotteret and Chernoff, 2006)。第一類的PAK對於嗜中性白血球超氧自由基生成、趨化作用以及吞噬作用有關(Bokoch, 2003; Martyn et al., 2005)。

不活化狀態的PAK以dimer的形態存在於細胞質中。PAK的活化過程 (圖1-9)，當small GTPase 與 PBD結合後，PAK構形受改變，使其AID與catalytic domain分開，促使activation loop 的autophosphorylation，進而增加 PAK 的活性 (Zenke et al., 1999; Lei et al., 2000)。第一類 PAK 的 activation loop 中，在Thr423的磷酸化對於PAK的活化極為重要 (Gatti et al., 1999)。另外，Ser144、Ser199 和 Ser204的磷酸化亦可促進PAK的活性 (Gatti et al., 1999; Chong et al., 2001)。Rac可藉由PAK影響p47<sup>phox</sup> 磷酸化作用 (Knaus et al., 1995)。此外，PAK可經由促進

其下游蛋白的磷酸化，例如 myosin light chain kinase、LIM kinase，進而影響細胞的趨化作用 (Daniels and Bokoch, 1999; Bokoch, 2003)。

## PKC

PKC為serine/threonine kinase，屬於 AGC kinase family當中一員到目前共發現 11 種異構物。PKC 結構的 N-terminal 是 regulatory region (含有 pseudosubstrate、C1與C2 domain)，C-terminal為catalytic region (含有C3 與 C4 domain)，兩者間經由一個hinge bond 連接。其中，pseudosubstrate 序列有 autoinhibition的作用，C1 domain 為DAG 和 PMA的結合位置 (Bell and Burns, 1991)；C2 domain 為鈣離子和 PS 的結合位置 (Igarashi et al., 1995)；C3 domain 為 ATP 結合的位置；C4 domain 為與受質結合的位置 (Silinsky and Searl, 2003)。依 regulatory region結構上的不同可將PKC分為classical PKC (cPKC)、novel PKC (nPKC)和atypical PKC (aPKC) 三個族群。cPKC包括PKC- $\alpha$ 、- $\beta$ I、- $\beta$ II 和 - $\gamma$ ，於 regulatory region具 pseudosubstrate、C1和C2 domain，需要PS、DAG 和鈣離子的存在下才可以活化。nPKC包括 PKC- $\delta$ 、- $\epsilon$ 、- $\eta$  和- $\theta$ ，在regulatory region 具有 pseudosubstrate和C1 domain，需要PS、DAG，但不需要鈣離子即可活化。aPKC包括 PKC- $\zeta$ 、- $\tau$  和- $\iota/\lambda$ ，其regulatory region 只有 pseudosubstrate domain、nuclear localization signals 和 nuclear export signals，因此不需要鈣離子和 DAG，但可受到磷脂類 (PS、PA 和 ceramides) 或轉移到細胞核受刺激而活化 (Newton, 2003)。

PKC 成熟至活化的過程：(1) 首先經轉譯作用剛合成尚未磷酸化且未成熟 (immature)的 PKC先停留在細胞質中；(2) PDK1 可使位於PKC catalytic region的 Thr500磷酸化；(3) PKC 進行 autophosphorylation 將本身C-terminal的Thr641 和 Ser660磷酸化，導致構形改變，此時為安定且成熟 (mature) 的 PKC而存在於細

胞質中 (Bornancin and Parker, 1997; Edward et al., 1999)。此構形變化使 N-terminal 的 pseudosubstrate 序列和 Thr500 結合並將 C 端的 catalytic region 遮蔽，因而抑制 PKC 的活性 (Gao et al., 2001)；(4) 當訊息刺激細胞時，細胞膜上脂質水解產生 DAG 和 IP<sub>3</sub>，增加細胞內鈣離子的濃度。而使 PKC 藉由 C1 domain 與 DAG 結合以及 C2 domain 和鈣離子結合，導致 PKC 轉移到細胞膜並且活化 (Newton, 2003; Di Mari et al., 2005)。PDK1 活化 PKC 的過程中，並不需要 PI3K 的參與，因此不論是否具有 PH domain 的 PDK1 都能活化 PKC (Newton, 2003)。

人類嗜中性白血球中，具有 PKC- $\alpha$ 、 $\beta$ I、 $\beta$ II、 $\delta$  和  $\zeta$  等 isoforms (Majumdar et al., 1993; Kent et al., 1996)。而大鼠的嗜中性白血球中具有 PKC- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\theta$ 、 $\mu$ 、 $\iota/\lambda$  和  $\zeta$ ，且 PKC $\lambda$  和 PKC $\zeta$  含量很少 (Tsao and Wang, 1997)。PKC- $\alpha$ 、 $\beta$ I、 $\beta$ II、 $\delta$  和  $\zeta$  皆與呼吸爆發有關。在嗜中性白血球細胞中，cPKC、PKC $\delta$  和 PKC $\zeta$  會對 p47<sup>phox</sup> 進行磷酸化 (El-Benna et al., 1996; Dang et al., 2001; Yamamori et al., 2004) 增加 NADPH oxidase 的活性 (Regier et al., 1999; Fontayne et al., 2002)。

## MAPK

MAPK 為 Ser/Thr kinase。MAPK 可依其訊息傳遞路徑之不同而分成幾類：p38 MAPK (p38 $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ / $\delta$  四種 isoforms)、ERK (ERK1/2 二種 isoforms)、c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) (JNK1/2/3 三種 isoforms)、ERK3、ERK4 及 ERK5 (Johnson and Lapadat, 2002)。其中，以 p38 MAPK、ERK1/2 與 JNK 活化的機轉研究最清楚 (Roux and Blenis, 2004)。嗜中性白血球表現有 ERK1/2 (Torres et al., 1993)，而 p38 MAPK 以  $\alpha$  與  $\delta$  兩種 isoforms 為主， $\beta$  與  $\gamma$  含量極少 (Hale et al., 1999)。

MAPK 活化的過程，主要是一連串的 kinase cascade，即 MAPK kinase kinase (MKKK/MEKK)、MAPK kinase (MKK/MEK) 及 MAPK 三個階段 (Kyriakis and Avruch, 2002) (圖 1-10)。當細胞受到刺激，經由 small G protein 活化 MKKK，然後對 MKK 進行磷酸化作用。活化的 MKK 會對下游的 MAPK 結構上的 T-X-Y 進行 Tyr/Thr 雙磷酸化作用 (English et al., 1999; Krens et al., 2006)。在 JNK 為 T-P-Y，在 ERK 為 T-E-Y，在 p38 MAPKs 為 T-G-Y。嗜中性白血球受到 fMLP 刺激後，會快速引起 ERK 和 p38 MAPK 磷酸化，並參與 p47<sup>phox</sup> 的磷酸化 (El-Benna et al., 1996)。此外，在嗜中性白血球中，ERK2 及 p38 MAPK 亦會參與 fMLP 引起的 p67<sup>phox</sup> 磷酸化 (Dang et al., 2003)。

在 NADPH oxidase 活化的過程中，有報告指出 p38 MAPK 的角色較 ERK1/2 為更重要 (Rane et al., 1997)。亦有報告指出，ERK1/2 並不參與調節 fMLP 所引起的 NADPH oxidase 活化 (Yu et al., 1995; Zu et al., 1998)。因而，ERK 是否參與調節嗜中性白血球 NADPH oxidase 活化，至今尚無定論。有文獻指出，p38 MAPK 的下游蛋白 MK-2 (Stokoe et al., 1992; Kummer et al., 1997) 為真正影響 NADPH oxidase 活化的調控因子 (Coxon et al., 2003)。

## PLC

哺乳動物細胞中具有五類的 PLC，分別為 PLC-β (1-4)、-γ (1-2)、-δ (1, 3, 4)、-ζ 及 -ε (Song et al., 2001; Saunders et al., 2002)。PLC 的蛋白結構包括具有 X 及 Y domain 形成一個 catalytic domain、PH domain、EF-hand domain 及 C2 domain (Katan, 1998)。因具有 EF-hand 與 C2 domain，所以需要鈣離子才可以活化 PLC (Rhee, 2001; Wing et al., 2003)。PLC-β、-γ、-δ 因具有 PH domain，所以可結合到含有 inositol 的磷脂質上。不同的 PLC 與不同的磷脂質結合，PLCβ 可與 PI(3)P 結合，PLCγ 與 PI(3,4,5)P<sub>3</sub> 結合 (Ferguson et al., 1995)，PLCδ 與 PI(4,5)P<sub>2</sub>

結合 (Razzini et al., 2000), PLC $\delta$ 1 可與 IP<sub>3</sub> 結合, 以迴饋調節酵素的活性 (Essen et al., 1996)。PH、SH2 與 SH3 domain 皆可促使 PLC 由細胞質轉移至細胞膜上 (Rhee, 2001)。PLC $\beta$  和 PLC $\gamma$  分別受細胞內的 G $\beta\gamma$  和 tyrosine kinases 調控。而 PLC $\delta$  會由鈣離子調控, 鈣離子和 PLC $\delta$  的 catalytic domain 結合使其構形產生變化 (Okada et al., 2005)。PLC $\epsilon$  可能是藉由 Ras 來調節 (Fukami, 2002)。

活化的 PLC 可水解細胞膜上的 PI(4,5)P<sub>2</sub> 生成 IP<sub>3</sub> 及 DAG, 為主要的二級訊息傳遞因子。DAG 可活化 PKC 或代謝成 PA, 進而影響下游訊息 (Andresen et al., 2002)。IP<sub>3</sub> 則作用到內質網上的 IP<sub>3</sub> receptors, 促進鈣離子由內質網釋出, 迅速增加細胞質內鈣離子濃度 (Berridge, 1989; Taylor, 1998)。細胞外的鈣離子可經由二種機制進入細胞。一為排空內質網中儲存的鈣離子後, 可促使 Ca<sup>2+</sup>-influx factor 擴散至細胞膜上, 造成鈣離子通道打開, 讓細胞外鈣離子持續內流 (Randriamampita and Tsien, 1993; Hallett and Pettit, 1997)。二為當排空內質網中儲存的鈣離子後, 原存在於內質網的 STIM1 與位於細胞膜上的 store-operated Ca<sup>2+</sup> channel 產生作用, 讓鈣離子內流 (Brechard and Tschirhart, 2008)。因此, 細胞內鈣離子濃度增加可分成二個階段, 第一階段源於內質網釋放儲存的鈣, 第二個階段則源於細胞外鈣離子內流。

## Cyclic AMP

Adenylyl cyclase 可促進 ATP 轉換成 cyclic AMP。而生成的 cyclic AMP 可經由 phosphodiesterases 水解。細胞內 cyclic AMP 的含量多寡取決於 Adenylyl cyclase 及 phosphodiesterases 兩種酵素活性之間的平衡。而增加細胞內 cyclic AMP 的含量, 可抑制嗜中性白血球超氧自由基的生成 (Cronstein et al., 1985)。已知 fMLP 刺激嗜中性白血球經由釋出 adenosine 作用到 A<sub>2</sub> adenosine receptor, 來活化 adenylyl

cyclase生成cyclic AMP (Spisani et al., 1996)。增加細胞內cyclic AMP會降低Akt的活性(Kim et al., 2001)。也有報告指出，增加細胞內cyclic AMP會抑制Ca<sup>2+</sup>進到細胞裡 (Schudt et al., 1991)。而fMLP刺激嗜中性白血球產生超氧自由基的作用是需要增加細胞內Ca<sup>2+</sup>。因此藥物影響細胞內cyclic AMP也會改變超氧自由基的生成。



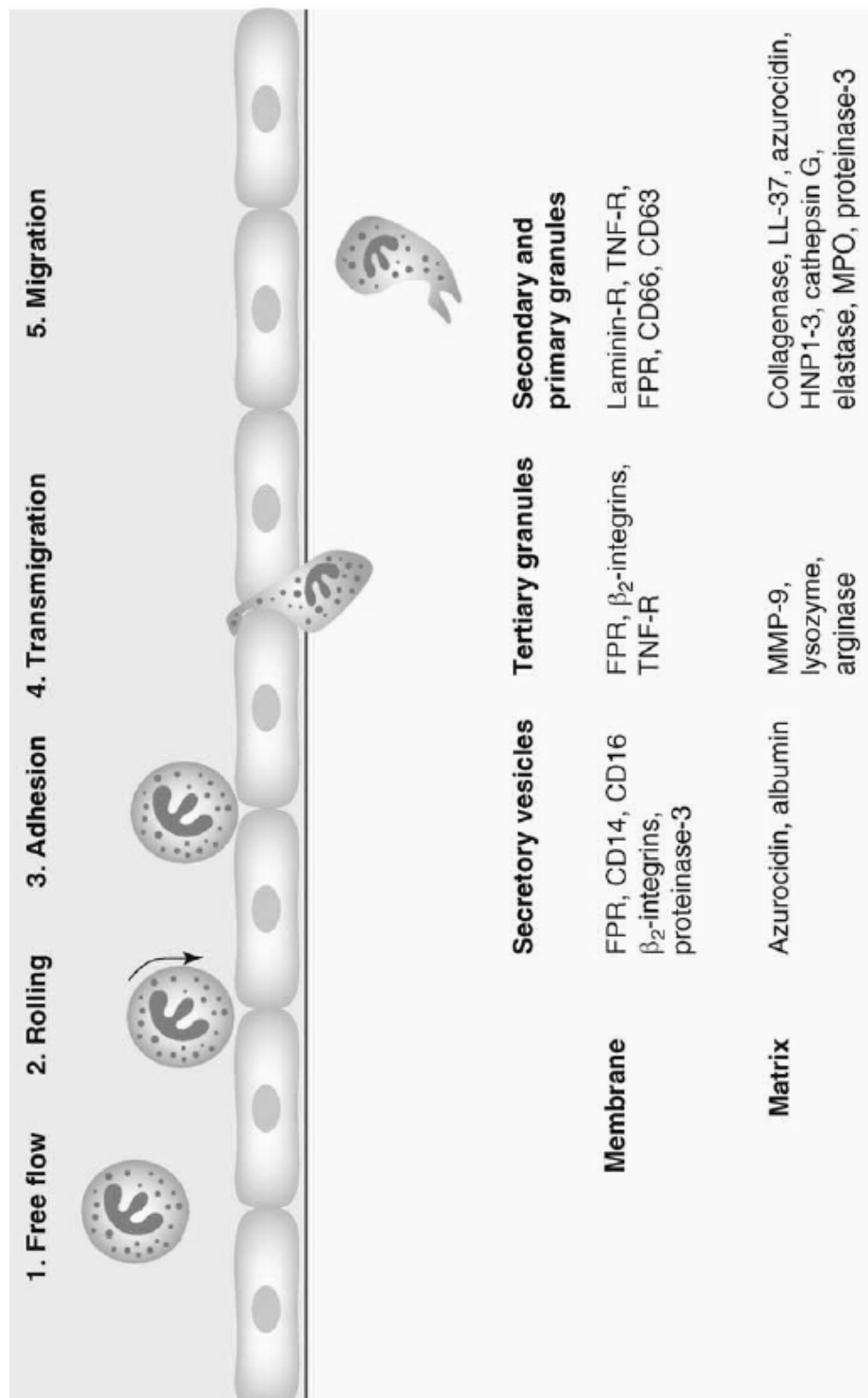
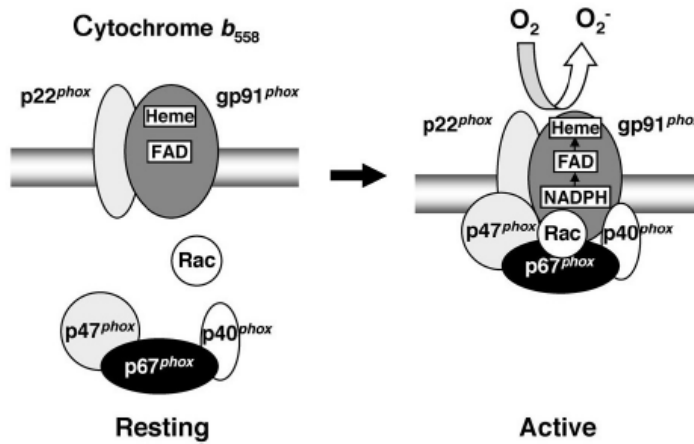


圖 1-1 PMN 在不同時期顆粒球分泌的物質

(節錄自 Soehnlein et al., 2009)



(1)



(2)

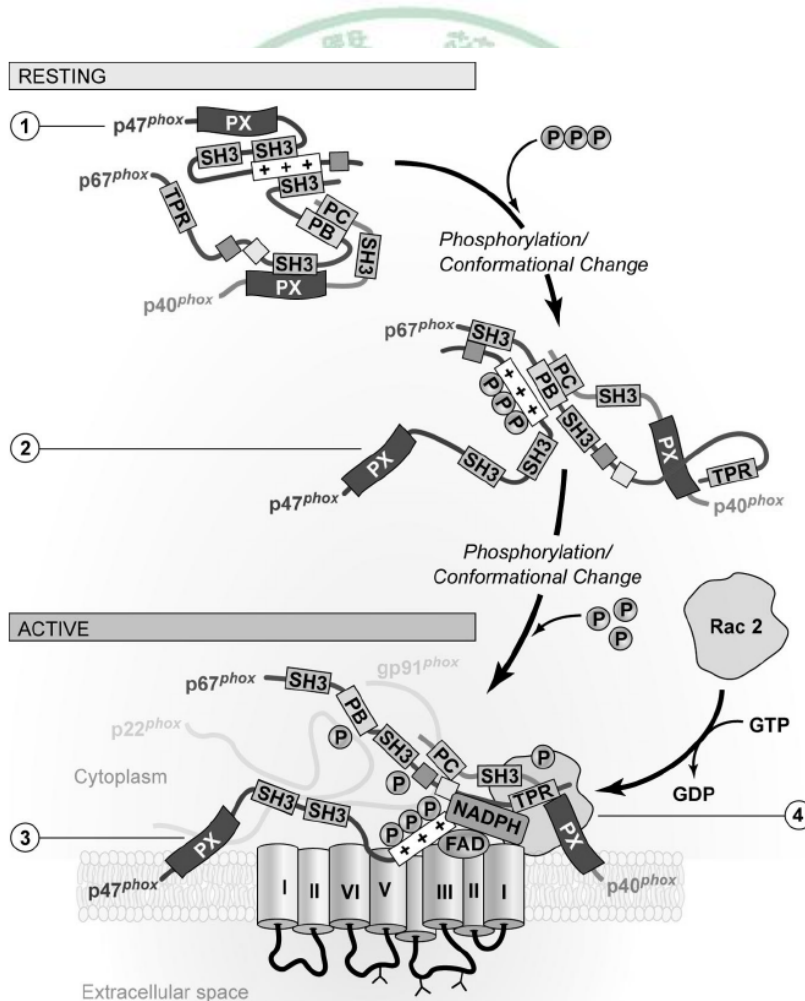


圖 1-2 (1) NADPH oxidase 組成結構的簡圖(節錄自 Takeya and Sumimoto, 2003)

(2) NADPH oxidase組成結構的詳圖(節錄自 Dale et al., 2008)

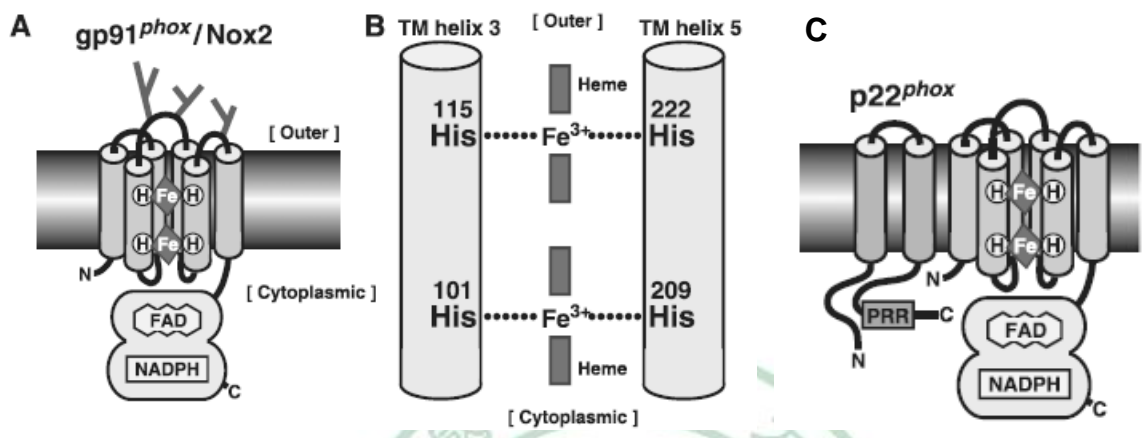


圖1-3 (A)  $gp91^{phox}/Nox2$ 的結構 (B) Bis-heme 嵌在  $gp91^{phox}$  中 (C) cytochrome  $b_{558}$  的結構 (節錄自Sumimoto, 2008)



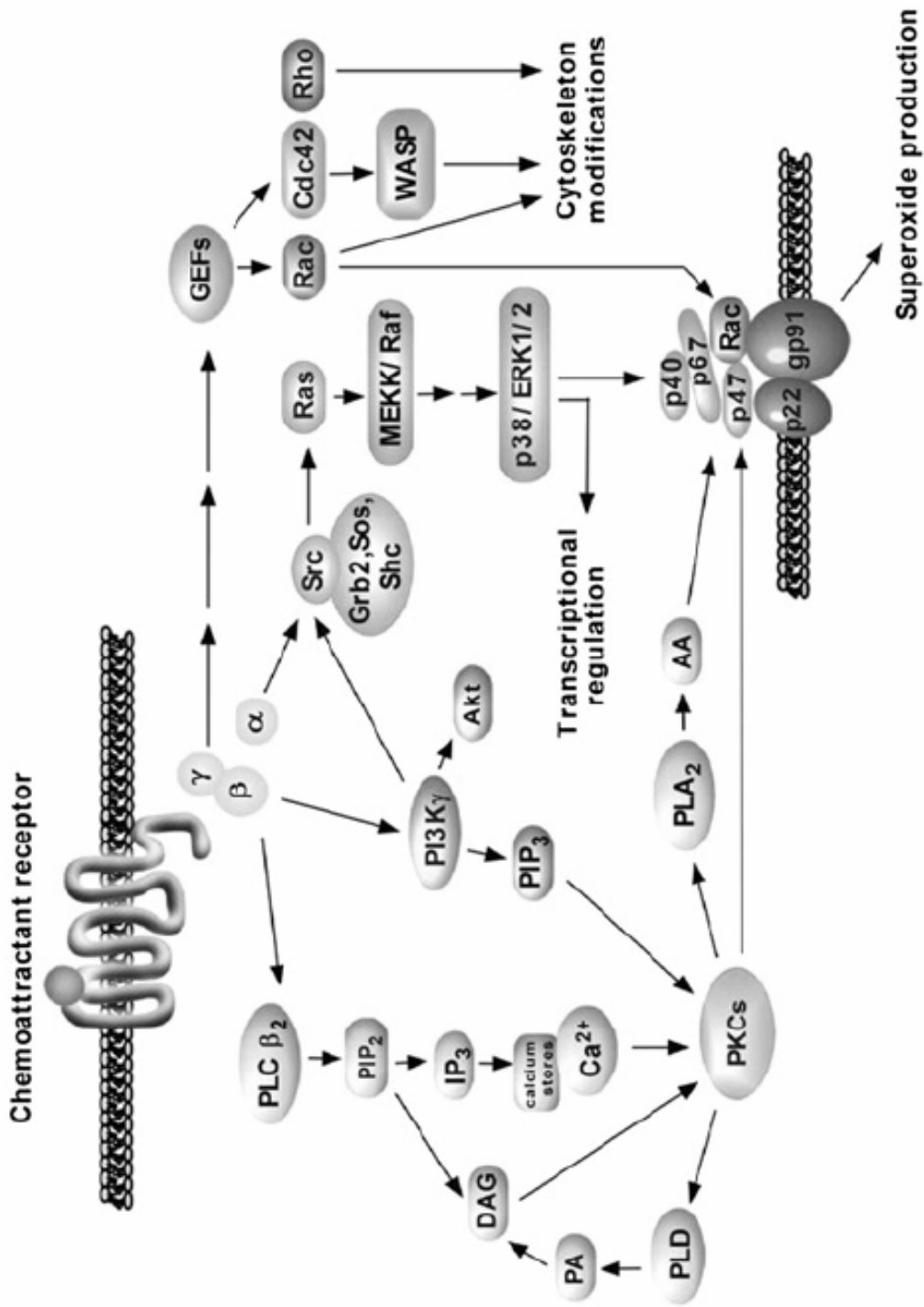


圖1-4 FPR在化學刺激物下的傳遞路徑 (節錄自Rabiet et al., 2007)

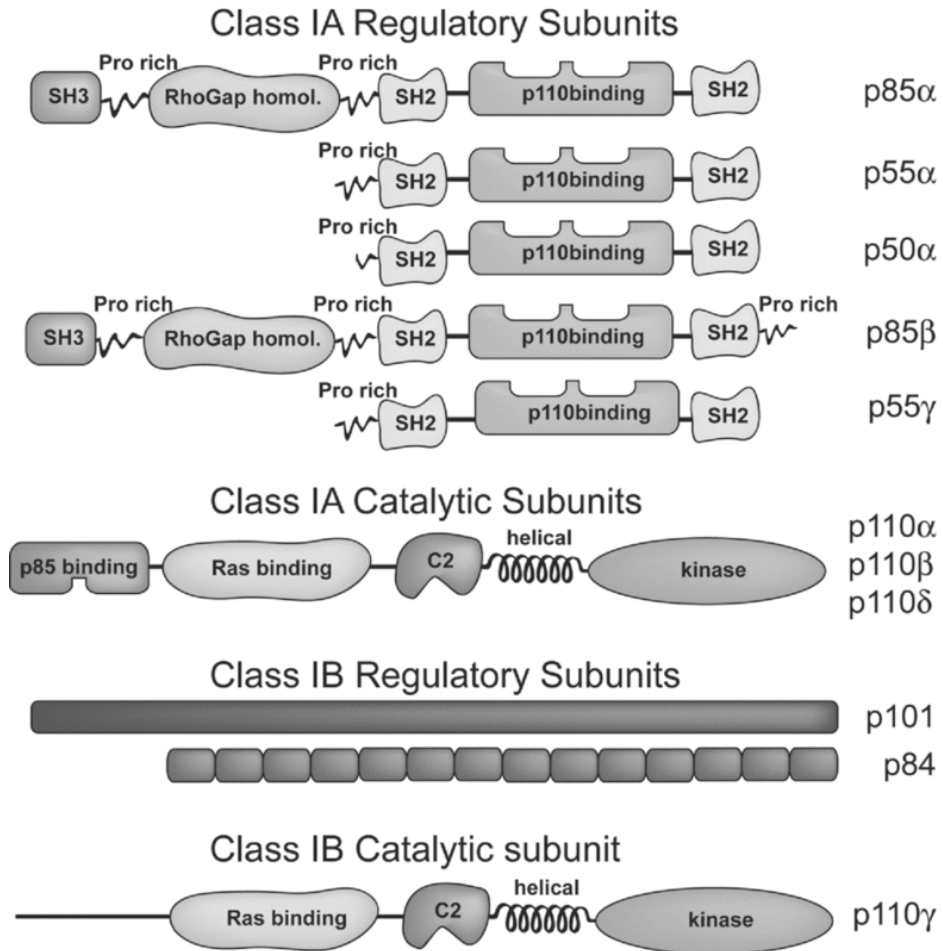


圖 1-5 PI3K class IA 和 IB 的結構

(圖片來源 <http://www.biochemsoctrans.org/bst/035/1109/bst0351109f01.htm>)

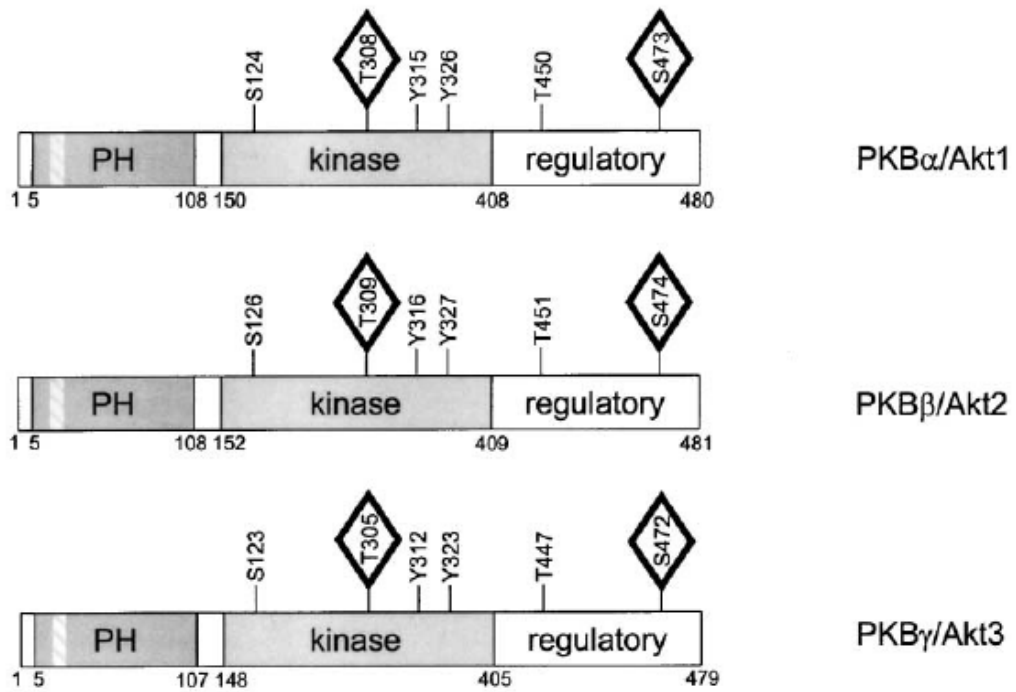
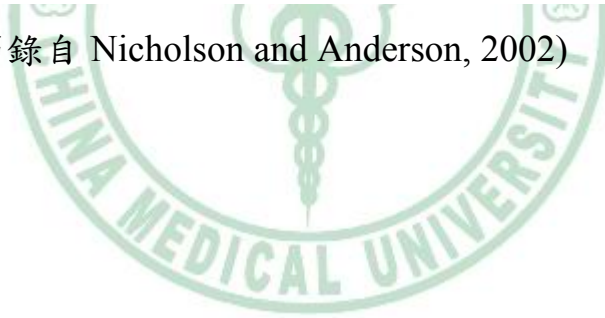


圖 1-6 Akt 的結構(節錄自 Nicholson and Anderson, 2002)



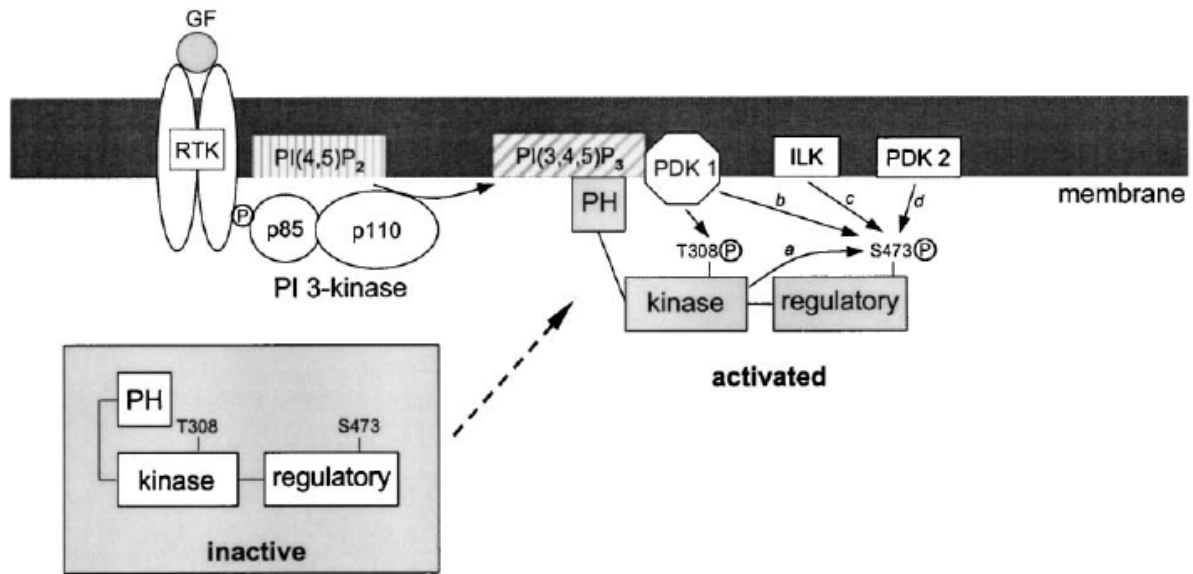
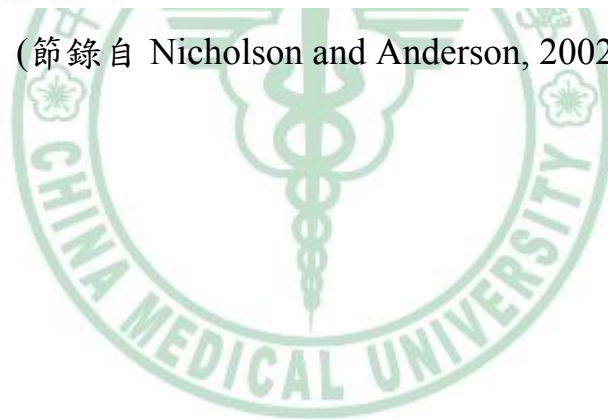


圖 1-7 Akt 活化機制 (節錄自 Nicholson and Anderson, 2002)



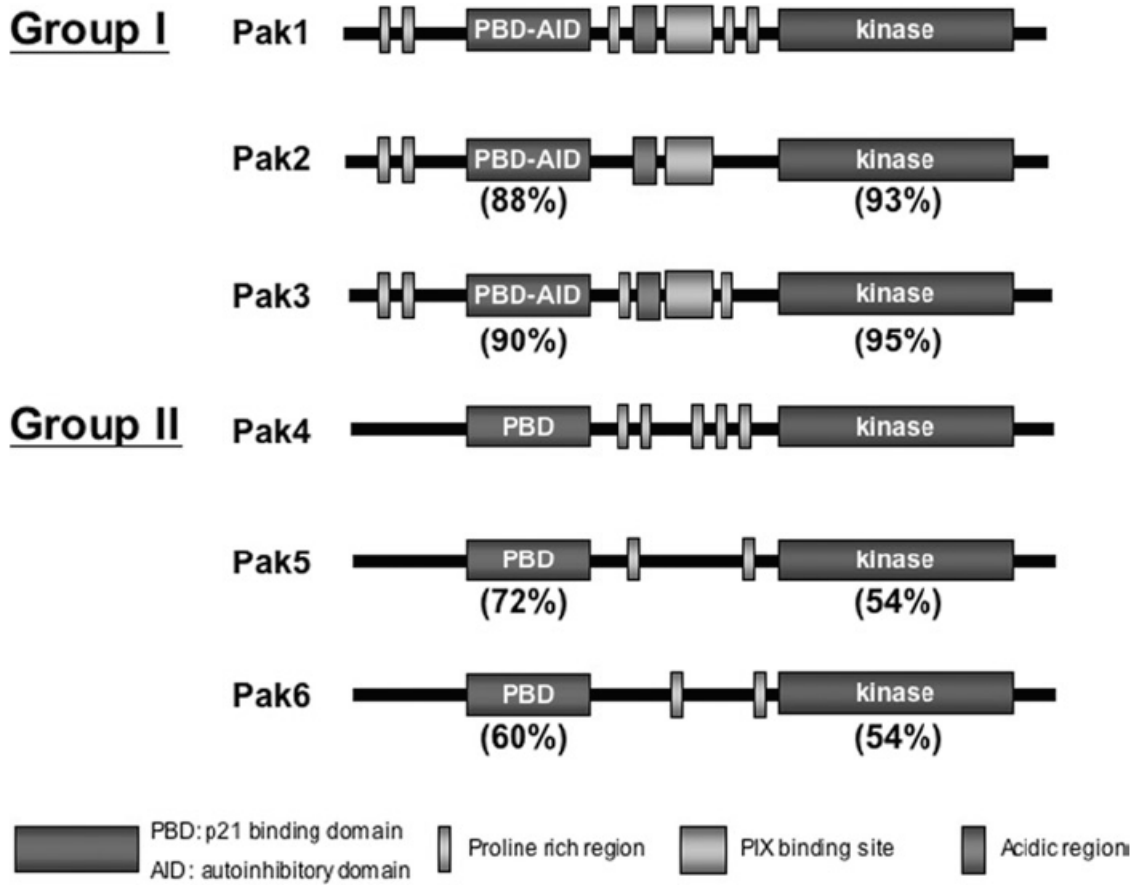
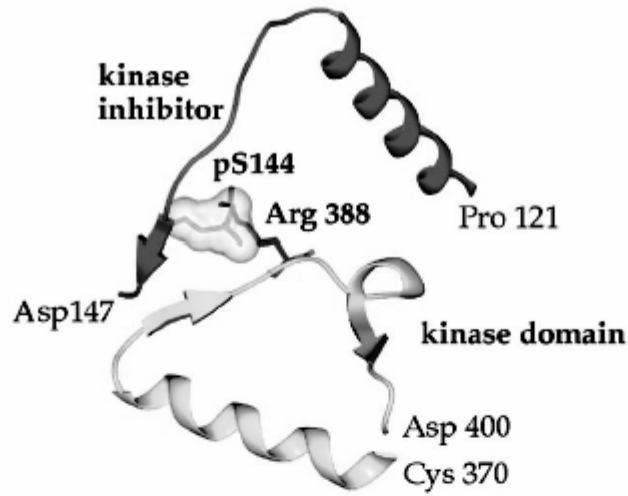


圖1-8 PAK的種類和基本結構 (節錄自 Arias-Romero and Chernoff, 2008)

A



B

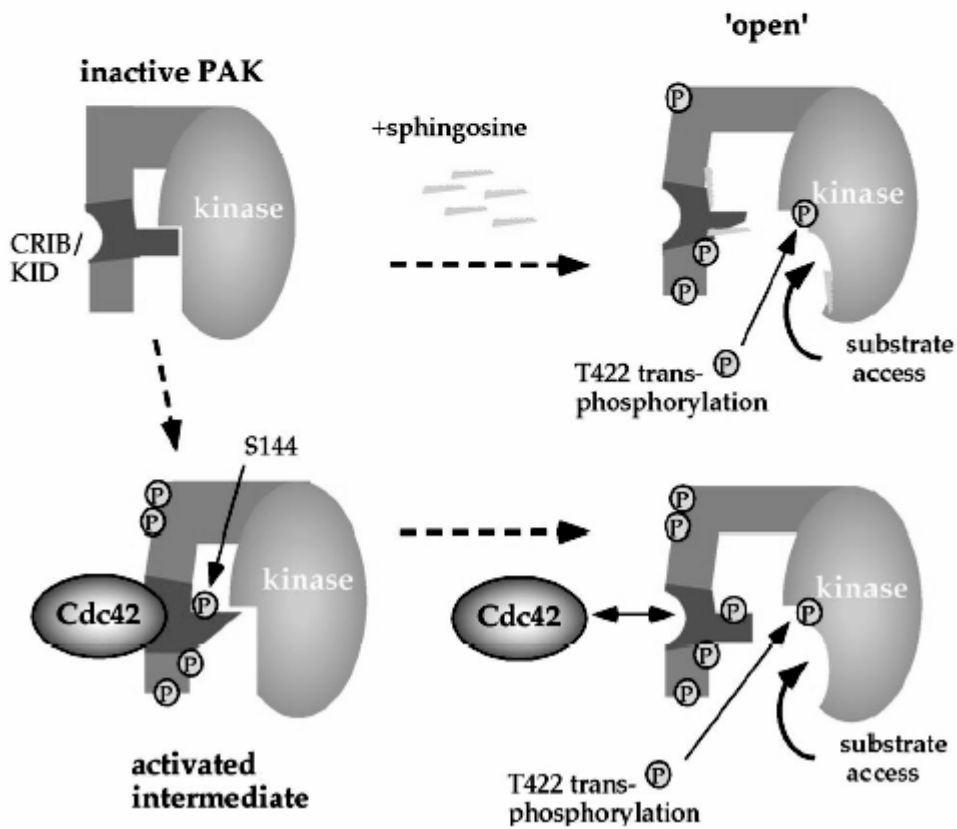


圖1-9 (A) PAK 基本結構 (B) PAK活化過程 (節錄自 Chong et al., 2001)



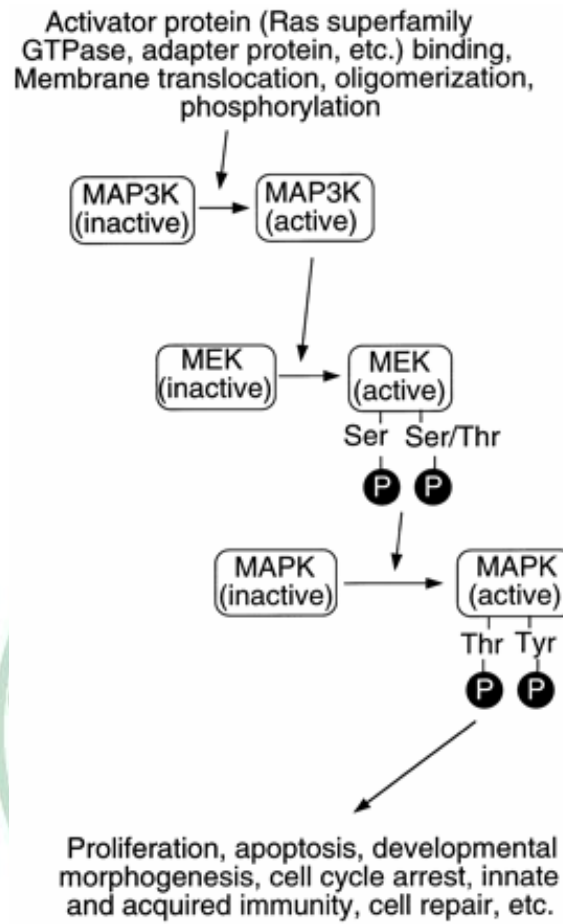


圖1-10 MAPK的活化機制 (節錄自Johnson and Lapadat, 2002)

## 第二章 研究動機與目的

嗜中性白血球為免疫機制的重要防線，利用生成的超氧自由基可殺死入侵的病源菌。但生成過多的超氧自由基也會造成組織、器官的損傷。因此抑制超氧自由基的生成，有助於改善嗜中性白血球過度活化所引起的病變。但在臨床上缺乏此類的抗發炎藥物。研究嗜中性白血球活化生成超氧自由基的機制，有助於研發抑制嗜中性白血球活化的抗發炎藥物。參與嗜中性白血球生成超氧自由基的細胞內訊息傳遞機制非常複雜，目前的了解仍然有限。對特定訊息傳遞途徑有專一作用的工具藥不足，在機制探討上也受限。經初步篩選結果發現新合成化合物TCH可抑制嗜中性白血球生成超氧自由基。本論文在探討TCH抑制嗜中性白血球細胞生成超氧自由基的作用機制，如對特定訊息傳遞路徑具有專一性的抑制效果，可作為藥理研究的工具藥。並期待能發展成為因過量超氧自由基造成疾病的治療用藥。

### 第三章 實驗部分

#### (一) 實驗材料

Hanks' balanced salt solution (HBSS) 購自 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)。Anti-RhoA (sc-418)、anti-p110  $\gamma$  (sc-1404)、anti-phospho-Akt1/2/3 (Ser473) (sc-7985)、anti-Akt1/2/3 (sc-8312)、anti-p22<sup>phox</sup> (sc-2078)、anti-p47<sup>phox</sup> (sc-17845 for IP)、anti-gp91<sup>phox</sup> (sc-20782 for IP)、anti-ERK2 (sc-154)、anti-p38 MAPK (sc-7149)、anti-PKC  $\alpha$  (sc-208)、anti-PKC  $\beta$  I (sc-209)、anti-PKC  $\beta$  II (sc-210)、anti-PKC  $\delta$  (sc-213)、anti-PKC  $\zeta$  (sc-216)、anti-vav (sc-132) 與 anti-phospho-vav(Tyr174) (sc-16408-R) 等抗體皆購自 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)。Anti-phospho-PAK1 (Thr423)/PAK2 (Thr402) (#2601)、anti-PAK1 (#2602)、anti-phospho-Akt (Thr308) (#9275)、anti-phospho-PDK1 (Ser241) (#3602)、anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (#9211)、anti-phospho-MK-2 (Thr222) (#3044)、anti-phospho-GSK3- $\alpha/\beta$  (Ser21/9) (#9331) 與 GSK3 fusion protein (#9237) 等抗體皆購自 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)。Anti-phosphoserine (4H4) (#ALX-804-165-C100) 與 (2'Z,3'E)-6-bromoindirubin-3'-oxime (6BIO) (#ALX-430-156-M001) 購自 Alexis (Carlsbad, CA, USA)。Polyvinylidene difluoride 轉漬膜、Immunoblot Western Chemiluminescent HRP Substrate 與 anti-gp91<sup>phox</sup> (#07-024)、anti-p67<sup>phox</sup> (#07-502)、anti-p47<sup>phox</sup> (#07-500)、anti-Rac2 (#07-604) 等抗體皆購自 Millipore (Bedford, MA, USA)。Anti-Rac1 (#R56220) 抗體購自 BD Biosciences (Palo Alto, CA, USA)。Cyclic AMP 購自 Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)。Akt/PKB kinase activity assay kit (#EKS-400A) 和 PKC kinase activity assay kit (#EKS-420A) 購自 Assay Designs (Cambridge, UK)。PDK1 kinase activity

assay kit (#CY-1180)購自 MBL International。PAK-p21-binding domain (PBD) protein agarose beads (#RT02) 購自 Cytoskeleton Inc. (Denver, CO, USA)。Active PDK1 (#P14-10H-05) 和 active Akt1 (#P16-10G-05) 購自 SignalChem。Dextran 500、Ficoll-Paque 及 protein A sepharose (#17-0780-01) 購自 GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA)。二級抗體購自 Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA)。2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY 294002) 購自 Biomol Research Laboratories (Plymouth Meeting, PA, USA)。4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazole (SB 203580) 及 2-[1-(3-dimethylaminopropyl)-1H-indol-3-yl]-3-(1H-indol-3-yl)-maleimide (GF 109203X) 購自 Merck (Taipei, Taiwan)。1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio) butadiene (U0126) 購自 Promega (Madison, WI, USA)。其他的化學藥品皆購自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。化學藥品溶於DMSO中，DMSO在培養液中的濃度小於0.1% (v/v)。

## (二) 分離大鼠的嗜中性白血球

以腹腔注射麻醉劑 pentobarbital (60 mg/kg) 麻醉大鼠 (Sprague Dawley, 300-350 g)。待大鼠昏迷後，由其腹腔動脈抽取全血且與含有 100 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 的針筒混合。再將血液與 5% dextran 混合後靜置。待大部分的紅血球沉降後，收集試管上層的血液。收集的血液用 Ficoll-Paque™ PLUS 離心 400 g，20°C，30 分鐘，以分離白血球 (Wang et al., 1994)。在試管底層的嗜中性白血球懸浮在 HBSS 其含有 10 mM HEPES (pH 7.3) 及 4 mM NaHCO<sub>3</sub> 中離心 (800 g，4°C) 10 分鐘。將懸浮細胞先以低張溶液 (0.05% (w/v) NaCl) 打破殘餘的紅血球，再以等體積的高張溶液 (1.75% (w/v)

NaCl 含 0.25% (w/v) bovine serum albumin) 調回等張。可製備純度及存活率皆  $\geq 95\%$  的嗜中性白血球懸浮液。

### (三) 測量 TCH 對細胞之存活率

利用 fluorescein diacetate (FDA; 測量存活之細胞) 染色的方式來檢驗 TCH 是否對細胞存活率造成影響，以確保 TCH 抑制超氧自由基的生成並非因細胞傷害或死亡所造成的。

嗜中性白血球懸浮於 HBSS 溶液中 ( $1 \times 10^6$  cells/0.5 ml)，於  $37^\circ\text{C}$  下預熱 3 分鐘，加入 DMSO (control) 或 TCH 反應 15 分鐘後，以五倍體積 HBSS 稀釋。離心 ( $500 g$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) 5 分鐘，再以 phosphate-buffered saline (PBS) 清洗一次，將細胞懸浮於  $50 \mu\text{l}$  的  $0.1\%$  (w/v) bovine serum albumin-PBS 中 block 30 分鐘，再加入 FDA ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) 於室溫下進行染色 30 分鐘，以 PBS 清洗三次，懸浮於  $400 \mu\text{l}$   $1\%$  (v/v) paraformaldehyde-PBS，以 Flow cytometry 進行偵測。

### (四) 測量 TCH 對嗜中性白血球產生超氧自由基的作用

嗜中性白血球懸浮液 ( $2 \times 10^6$  cells/0.4 ml HBSS) 先與 cytochrome *c* ( $0.5 \text{ mg/ml}$ )、cytochalasin B ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) 和  $\text{CaCl}_2$  ( $1 \text{ mM}$ ) 於試管中混合，置於  $37^\circ\text{C}$  中預熱 3 分鐘。在加入不同濃度的 DMSO、TCH 或  $3 \mu\text{M}$  diphenylene iodonium (DPI) 作用五分鐘後，以  $1 \mu\text{M}$  fMLP 刺激細胞 10 分鐘，加入  $100 \text{ U/ml}$  superoxide dismutase (SOD) 中止反應。另外含有  $100 \text{ U/ml}$  SOD 的細胞懸浮液當作背景值 (blank)。將反應後的細胞懸浮液，在離心去除細胞後，將上清液吸取  $300 \mu\text{l}$  至 96 孔盤中，以  $550 \text{ nm}$  波長讀取吸光值 (Wang et al., 2003)，並計算 TCH 對超氧自由基抑制的程度。

### (五) 測量 TCH 對超氧自由基的清除作用

測量 dihydroxyfumaric acid (DHF) 自發性氧化反應。試管中含 0.891 mM DHF 及 0.274 mM nitroblue tetrazolium (NBT)，且以含有 60 U/ml 的SOD作為對照組。在加入 TCH 室溫下反應 15 分鐘後，將溶液轉移至 96 孔盤，讀取 560 nm吸光值的變化 (Goldberg and Stern, 1977)。

### (六) 測量 TCH 對 xanthine-xanthine oxidase 產生超氧自由基的影響

將 phosphate buffer (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.4)、0.1 mM EDTA)中加入 20 mU/ml xanthine oxidase、DMSO (control)或 TCH、ferricytochrome *c*在37°C下培養5分鐘，以 0.15 mM xanthine 開啟反應，以分光光譜儀 550 nm 連續讀取 4 分鐘吸光值的變化 (Selloum, et al., 2001; Wang et al., 1994)。

### (七) TCH影響細胞生成超氧自由基之可逆性

實驗組嗜中性白血球懸浮液 (2 × 10<sup>6</sup> cells/0.4 ml HBSS) 先與 cytochalasin B (5 µg/ml) 及 CaCl<sub>2</sub> (1 mM) 於試管中混合，並置於 37°C 中預熱 3 分鐘。加入 TCH或DMSO作用5分鐘，加入0.8 ml HBSS 稀釋，以HBSS清洗兩次。而對照組細胞懸浮液與 cytochrome *c* (0.5 mg/ml)、cytochalasin B (5 µg/ml) 和 CaCl<sub>2</sub> (1 mM) 於試管中混合，置於37°C中預熱 3 分鐘。加入TCH或DMSO作用5分鐘。兩組細胞懸浮液以 1 µM fMLP 刺激細胞 10 分鐘，加入 100 U/ml SOD中止反應。另外以含有 100 U/ml SOD的細胞懸浮液當作背景值 (blank)。離心取上清液 300 µl至96孔盤中，以550 nm讀取吸光值。

## (八) 測量 TCH 對 NADPH oxidase 活性的影響

含嗜中性白血球細胞膜分劃 (50  $\mu\text{g}$  蛋白質的量) 及細胞質分劃 (250  $\mu\text{g}$  蛋白質的量) 的懸浮液，在 ferricytochrome *c* 存在下，加入 150  $\mu\text{M}$  arachidonic acid (AA)後，再加入 DMSO (control)、TCH 或 3  $\mu\text{M}$  DPI 共浴 3 分鐘，以 200  $\mu\text{M}$  NADPH 開啟反應。利用分光光譜儀在 550 nm 下，記錄 10 分鐘的吸光值的變化。超氧自由基產量的計算方式： $\text{superoxide anion (nmol)} = \Delta A \times 47.4 \times 1.5 \text{ ml}$ 。

## (九) 免疫沈澱分析

嗜中性白血球 ( $2 \times 10^7$  cells/0.5 ml HBSS) 置於 37°C 中預熱 3 分鐘，加入藥物反應 5 分鐘後，以 1  $\mu\text{M}$  fMLP 刺激。細胞反應後加入冰 HBSS 減緩反應，離心 (800 *g*, 4°C) 2 分鐘。將細胞溶解於 MLB buffer (25 mM HEPES pH 7.5、150 mM NaCl、1% Igepal CA-630、10 mM  $\text{MgCl}_2$ 、1 mM EDTA、2% glycerol、1 mM NaF、1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride 與 10  $\mu\text{g/ml}$  aprotinin、pepstatin A、leupeptin 及 antipain)，靜置於冰上 10 分鐘。待離心 (1,000 *g*, 4°C) 10 分鐘後，收集上清液。

取 500  $\mu\text{g}$  上清液蛋白質與 anti-p47<sup>phox</sup> 抗體於 4°C 下翻轉混合反應過夜。隔日加入 protein A sepharose beads 於 4°C 下翻轉混合反應 2 小時。Sepharese 再以 MLB buffer 清洗二次，加入 5 x Laemmli sample buffer，煮沸 15 分鐘。蛋白質以 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 展開，並轉移至 polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜上。以含 5% 脫脂奶粉的 TBST buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl 和 0.1% Tween 20) 填充後，用 anti-p47<sup>phox</sup>、anti-phosphoserine、anti-PKC 或 anti-p22<sup>phox</sup> 抗體偵測。以 Luminescent

Image Analyzer (Fujifilm LAS-3000) 照相，並以 MultiGauge software 分析。

#### (十) 細胞膜轉移作用

嗜中性白血球( $2 \times 10^7$  cells/0.5 ml HBSS)置於 37°C 中預熱 3 分鐘，加入藥物反應 5 分鐘後，以 1  $\mu$ M fMLP 刺激。加入 isolation buffer (0.34  $\mu$ M sucrose、10 mM Tris-HCl (pH 7.0)、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、1 mM NaF、1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  及 10  $\mu$ g/mL leupeptin、antipain、aprotinin 和 pepstatin A)。於冰浴中，以超音波打破細胞終止反應後離心 (800 g, 4°C) 10 分鐘。取上清液進行超高速離心 (130000 g, 4°C) 30 分鐘。取沉澱物為細胞膜分割。以 Lowry method 定量蛋白後，10% 的 SDS-PAGE 展開，並轉移至 PVDF 膜上。以含 5% 脫脂奶粉充填後，用 anti-Akt 及 anti-phospho-PDK1 抗體反應來辨識。同時利用 anti- $\text{G}_\beta$  抗體辨識作為 loading control。

#### (十一) 測量蛋白質的磷酸化

在 37°C 下，嗜中性白血球 ( $5 \times 10^6$  cells) 與藥物反應後，再以 1  $\mu$ M fMLP 刺激，最後加入 5 x Laemmli sample buffer (250 mM Tris-HCl pH 6.8、50% glycerol、10% SDS) 打破細胞終止其反應。離心並收集上清液，以去除多餘的殘渣，用 Lowry method 定量蛋白。蛋白質以 10% 的 SDS-PAGE 展開，轉移至 PVDF 膜上。以含 5% (w/v) 脫脂奶粉的 TBST Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl 和 0.1% Tween 20) 充填空隙後，用 anti-phospho-p38 MAPK、anti-phospho-MK2、anti-phospho-Akt (Ser473)、anti-phospho-Akt (Thr308) 或 anti-phospho-PAK (PAK1 (Thr423)/PAK2 (Thr402) 抗體辨識。辨識後的 PVDF 膜，利用 stripping buffer (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)、100 mM  $\beta$ -mercaptoethanol



和 2% SDS) 在 50°C 清洗 15 分鐘後，再次以含 5% (w/v) 脫脂奶粉的 TBST Buffer 充填膜後。並以 anti-p38 MAPK、anti-Akt、anti-PAK1 或 anti-Vav1 抗體辨識作為 loading control。

## (十二) 測量 TCH 對 Rac2 活化

在 37°C 反應後的嗜中性白血球 ( $2 \times 10^7$  cells) 懸浮液，以 5 倍體積的 HBSS 減緩反應後，離心 (500 g, 4°C) 5 分鐘。將細胞以 0.5 ml 的 MLB 溶液 (10 mM MgCl<sub>2</sub>、25 mM HEPES、1% Igepal CA-630、150 mM NaCl、1 mM EDTA、2% glycerol) 將細胞打破，靜置於冰上 10 分鐘。離心 (10000 g, 4°C) 10 分鐘，收集上清液，以 Bradford method 定量蛋白至 400 µg，加入 PAK-GST-beads 在 4°C 下，反應一小時。之後，將殘留的抗體清洗乾淨後，加入 5 x Laemmli sample buffer。再以西方墨點法偵測 Rac2。利用 total Rac2 細胞 lysate 作為 loading control。

## (十三) PDK1 kinase 活性之測量

利用 PDK1 activity assay kit 測量。將 DMSO、TCH 或 3 µM 6BIO 先與 active PDK1 (5 munit/assay) 在 30°C 反應 5 分鐘。取 100 µl 反應液，加入 62.5 µM ATP 在 30°C 反應 30 分鐘，清洗後，加入 anti-phospho-AKT (T308) 抗體於室溫反應 30 分鐘。清洗後，加入 HRP 連結的二次抗體在室溫反應 30 分鐘。清洗後，在加入 Substrate Reagent 於室溫反應 5 分鐘，加入 Stop Solution，以 450 nm 偵測。

## (十四) Akt 和 PKC kinase 活性之測量

嗜中性白血球 ( $4 \times 10^6$  cells/0.5 ml HBSS) 與藥物反應後，再以 1 µM fMLP

刺激。細胞反應液以冰的HBSS停止反應，離心(800 g, 4°C) 2 分鐘，移去上清液。將細胞溶解於於lysis buffer (20 mM MOPS (pH 7.2)、1% NP-40、5 mM EGTA、2 mM EDTA、50 mM  $\beta$ -glycerophosphate、1 mM dithiothreitol、50 mM NaF、1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、1 mM benzamidine、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的aprotinin、pepstatin A、leupeptin 及 antipain)後，靜置於冰上10分鐘。經離心(10,000 g, 4°C) 10 分鐘後，取上清液以Akt/PKB 或是PKC kinase activity assay kit 進行分析。或細胞經fMLP刺激，取得細胞溶解液。經離心取上清液，與DMSO 或藥物反應後，以Akt/PKB kinase activity assay kit進行分析。或human recombinant active Akt1 (30 ng/assay) 與DMSO、TCH或rotterlin反應後。取 30  $\mu\text{l}$  反應液，加入 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ATP在30°C反應60分鐘，然後加入Phosphospecific Substrate 抗體於室溫反應60分鐘。清洗後，加入HRP連結的二次抗體在室溫反應 30分鐘。清洗後，在加入TMB Substrate於室溫反應60分鐘後，加入Stop Solution，以450 nm偵測。

#### (十五) Cyclic AMP 之測量

嗜中性白血球( $2 \times 10^6$  cells/0.2 ml HBSS)置於 37°C 中預熱 3 分鐘，加入 DMSO、TCH 或 isoproterenol (3  $\mu\text{M}$ )反應 5 分鐘，以 0.1 M HCl 停止反應，置於冰上 20 分鐘。以超音波震盪打破細胞，離心(1,000 g, 4°C) 10 分鐘，取上清液，加入 KOH 中和。加入 acetic anhydride 混合均勻，利用 cyclicAMP EIA kit 進行分析。將反應液加入 tracer 和 antiserum 抗體在室溫反應過夜，在清洗後，加入 Ellman's Reagent 在室溫反應 1 小時，以 405-420 nm 偵測。

#### (十六) 統計分析

實驗數據以  $\text{mean} \pm \text{S.D.}$  來呈現。兩組數據比較時，以 student  $t$ -test 分析差異。多組數據比較時，則是先以 ANOVA 分析後，由 Bonferroni  $t$ -test 來比較差異。 $p$  值小於 0.05 視為具有顯著差異性。



## 第四章 結果與討論

### 一、TCH 抑制超氧自由基生成

嗜中性白血球先與不同濃度(1-30  $\mu\text{M}$ )的 TCH 反應 5 分鐘後，以 1  $\mu\text{M}$  fMLP 刺激超氧自由基生成。結果 TCH 可以濃度依存性(concentration-dependent)抑制 fMLP 所誘導的超氧自由基之生成，在 1  $\mu\text{M}$  時即有顯著性差異，其  $\text{IC}_{50}$  值為  $4.5 \pm 0.8 \mu\text{M}$ 。而已知 NADPH oxidase 的抑制劑 DPI 在 3  $\mu\text{M}$  可抑制 80% (圖 2-1)。而若以 5  $\mu\text{M}$  的 TCH 先與細胞反應不同的時間，發現其反應時間長短對於其抑制效果並無大的差異，在 1 分鐘的抑制作用為 65%，至 15 分鐘時的抑制作用為 75% (圖 2-2)。後續的實驗中細胞在刺激前均先與 TCH 反應 5 分鐘。利用 FDA 染色測試 TCH 是否會影響細胞存活，結果顯示分別在 DMSO、10  $\mu\text{M}$  和 20  $\mu\text{M}$  的濃度下細胞的存活率仍有 95%、94% 和 93% (圖 2-3)，因此排除 TCH 因降低細胞存活而抑制超氧自由基生成之可能性。

TCH (1-10  $\mu\text{M}$ )對 DHF 的自體氧化(autoxidation)並無顯著影響，因此 TCH 不同於 SOD，不具有超氧自由基清除者的作用(圖 2-4)。另外 xanthine oxidase 與 TCH (1-10  $\mu\text{M}$ )反應 5 分鐘後，以 xanthine 開啟反應，結果也顯示 TCH 不會減少超氧自由基生成(圖 2-5)。若細胞經 10  $\mu\text{M}$  TCH 處理後，可經由 HBSS 清洗細胞而使 TCH 喪失抑制超氧自由基生成的能力(圖 2-6)。偵測 TCH 是否直接影響 NADPH oxidase 的活性，可藉由 AA 促進聚集 NADPH oxidase 的細胞質和細胞膜組成蛋白而引起超氧自由基生成之特性。在 AA 活化 NADPH oxidase 後，再加入 TCH (1-10  $\mu\text{M}$ )，發現 TCH 不會抑制 NADPH oxidase 的活性 (圖 2-7)。相反地，抑制劑 DPI 則可明顯地抑制 NADPH oxidase 的活性。實驗結果顯示，TCH

抑制 fMLP 所誘導的超氧自由基之生成，可能是抑制細胞內訊息傳遞路徑而來。

## 二、TCH 對 NADPH oxidase 聚集之影響

在 NADPH oxidase 活化時，位於細胞質中的組成蛋白 p40<sup>phox</sup>、p47<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup> 和 Rac2 會轉移至細胞膜與 flavocytochrome b<sub>558</sub> (p22<sup>phox</sup> 和 gp91<sup>phox</sup>) 連結。因此，利用 p47<sup>phox</sup> 抗體做免疫沈澱分析，顯示 TCH 可抑制 p47<sup>phox</sup> 與 p22<sup>phox</sup> 的結合，在 3  $\mu$ M 和 10  $\mu$ M TCH 的抑制百分比分別為 59% 和 77%，IC<sub>50</sub> 為 4.5  $\pm$  4.0  $\mu$ M。另外，在 p47<sup>phox</sup> 的 serine 磷酸化可促進 p47<sup>phox</sup> 和 p22<sup>phox</sup> 間的連結 (Ago et al., 2003)。而 fMLP 可明顯地增加 p47<sup>phox</sup> 結構上的 serine 磷酸化作用，此作用亦被 TCH 所抑制，在 3  $\mu$ M 和 10  $\mu$ M TCH 分別有 55% 和 75% 的抑制作用，IC<sub>50</sub> 為 4.4  $\pm$  3.0  $\mu$ M (圖 2-8)。

Rac2 為 NADPH oxidase 活化的重要蛋白質。Rac2 活化時可與 GTP 結合進而轉移至細胞膜上 (Bokoch, 2005)。利用 gp91<sup>phox</sup> 抗體做免疫沈澱分析，顯示在 3  $\mu$ M 和 10  $\mu$ M TCH 分別有 58% 和 79% 的抑制 Rac2 和 gp91<sup>phox</sup> 間的連結作用，IC<sub>50</sub> 為 2.3  $\pm$  1.5  $\mu$ M。由於 PAK-PBD protein agarose 與 Rac-GTP 結合，可用來偵測活化的 Rac2。結果顯示 TCH 可抑制 Rac2 的活化 (在 10  $\mu$ M TCH 時可抑制 69%)，IC<sub>50</sub> 為 9.2  $\pm$  0.6  $\mu$ M (圖 2-9)。

綜合以上結果，推測 TCH 是影響細胞內訊息傳遞，進而抑制 p47<sup>phox</sup> 和 p22<sup>phox</sup> 以及 Rac2 和 gp91<sup>phox</sup> 間的連結，導致 NADPH oxidase 產生超氧自由基的活性受抑制。

## 三、TCH 對 Akt 活化之影響

有文獻指出，在人類嗜中性白血球，PI3K 參與超氧自由基的生成作用 (Didichenko et al., 1996)。PI3Ks 可分成 Class I (I<sub>A</sub> 與 I<sub>B</sub>)、II 和 III，目前研究較清楚的是 Class I (Vanhaesebroeck et al., 2005)。在 fMLP 刺激下，Class I<sub>B</sub> 當中的 PI3K $\gamma$  扮演超氧自由基生成的重要角色 (Condliffe et al., 2005)。PI3K 的活化促進 PI(3,4,5)P<sub>3</sub> 的生成，其可幫助 Akt 和 PDK1 轉移至細胞膜上。而大鼠嗜中性白血球在 fMLP 的刺激下，5 秒即有明顯的 Akt 和 PDK1 轉移至細胞膜上，在 15 秒時達到高峰之後隨即下降(圖 2-10)。

在 fMLP 刺激下，Akt 會對 p47<sup>phox</sup> 磷酸化，增強 NADPH oxidase 的活性 (El-Benna et al., 2009)。在圖 2-11 (1) 顯示，fMLP 可明顯地促進 Akt 與 p47<sup>phox</sup> 間的連結作用，TCH 可濃度依存性地降低此一連結，IC<sub>50</sub> 為 7.3 ± 1.7  $\mu$ M。而完全活化的 Akt 是在 catalytic site 上的 Thr308 和 hydrophobic motif 上的 Ser473 都被磷酸化。PDK1 可磷酸化 Thr308，而磷酸化 Ser473 是受到 PDK2 的作用。在人類嗜中性白血球中，MK-2 被認為是 PDK2 (Rane et al., 2001; Burelout et al., 2007)。fMLP 刺激大鼠嗜中性白血球，會促進 Akt Thr308 和 Ser473 的磷酸化。藉由西方墨點法，TCH 在 3  $\mu$ M 和 10  $\mu$ M 抑制 fMLP 所誘導的 Akt (Thr308) 磷酸化分別為 24% 和 40%。而 Akt (Ser473) 的磷酸化，在 10  $\mu$ M TCH 抑制程度亦有 51%。PI3K 抑制劑 LY 294002 (10  $\mu$ M) 能有效地抑制 fMLP 所誘導的 Akt 磷酸化作用(圖 2-11 (2))。因此可推測 TCH 會影響 Akt 的活性。藉由 Akt activity assay kit 偵測 Akt 的活性，發現 TCH 有濃度依存性抑制 Akt 活性，IC<sub>50</sub> 為 7.9 ± 3.2  $\mu$ M (圖 2-12 (1))。而在 fMLP 刺激的細胞溶解液中，TCH 無法抑制 Akt 活性(圖 2-12 (2))。此結果可推測，TCH 影響 Akt 活性為抑制其上游路徑。但是，TCH (3  $\mu$ M 和 10  $\mu$ M) 可抑制 active human recombinant Akt1，抑制程度分別為 22% 和 33%，而 Akt1 活性的抑制劑 rottlerin (20  $\mu$ M) 也有 90% 的抑制程度(圖 2-12 (3))。此差異可能是由於細胞的萃取液中，含有 Akt1/2/3 三種 isoform 的活性，而 TCH 則只

抑制 Akt1 的活性，而其他兩種 isoform 的活性也許還存在，有待進一步研究。此結果顯示 Akt 可能參與 TCH 抑制 p47<sup>phox</sup> 磷酸化。

#### 四、TCH 對 PDK1 活性之影響

PDK1 為一持續性活化與自體磷酸化之酵素，PDK1 蛋白 Ser241 的磷酸化對於其活性極為重要(Casamayor et al., 1999)。TCH (5  $\mu$ M 和 10  $\mu$ M)可抑制 active human recombinant PDK1，抑制程度分別為 65%和 70% (IC<sub>50</sub> 為 7.2  $\pm$  2  $\mu$ M)，而 PDK1 活性的抑制劑 3  $\mu$ M 6BIO 也有 86%的抑制程度(圖 2-13 (1))。當嗜中性白血球以 fMLP 刺激時，可增加細胞膜上 Akt 和 phospho-PDK1 (Ser241)，但是 TCH 不會減少細胞膜上 Akt 與 phospho- PDK1 的含量 (圖 2-11 (3)；圖 2-13 (2))。推測 TCH 可能並不會影響 PI3K 生成 PIP<sub>3</sub>，因此 Akt 和 phospho-PDK1 仍可轉移到細胞膜上。此結果顯示 TCH 抑制 Akt 的活化可能來自於抑制 PDK1 的活性。

#### 五、6BIO 對嗜中性白血球之影響

為了證明 PDK1、Akt 與 p47<sup>phox</sup> 確實與超氧自由基的生成有關，所以利用已知 PDK1 活性的抑制劑 6BIO 來探討。經由 PDK1 activity assay kit 方法確認 6BIO 抑制 active human recombinant PDK1 的 IC<sub>50</sub> 為 0.8  $\pm$  0.5  $\mu$ M (圖 2-14 (1))，與文獻相近(Zahler et al., 2007)。以西方墨點法檢測 6BIO 抑制 Akt 磷酸化的程度，顯示 6BIO (3  $\mu$ M 和 10  $\mu$ M) 抑制 Akt Thr308 磷酸化的程度分別為 35%和 60% (IC<sub>50</sub> 為 9.2  $\pm$  3.5  $\mu$ M)，而 LY 294002 (10  $\mu$ M)有 79%的抑制程度。而 6BIO (3  $\mu$ M 和 10  $\mu$ M)抑制 Akt Ser473 磷酸化的程度分別為 53%和 66% ( IC<sub>50</sub> 為 6.7  $\pm$  3.6  $\mu$ M)，而 LY 294002 (10  $\mu$ M)有 99%的抑制程度 (圖 2-14 (2))。至於為何 6BIO 會抑制 Akt Ser473 的磷酸化？有報告指出 Akt 在 Thr308 磷酸化後，會對 Ser473

位置自體磷酸化 (Rane et al., 2001; Dong and Liu, 2005) , 或者是 6BIO 的專一性不佳, 也抑制了 PDK2 的活性。在 fMLP 誘導的大鼠嗜中性白血球生成超氧自由基的實驗中, 6BIO (10  $\mu$ M 和 30  $\mu$ M) 抑制超氧自由基程度分別為 27% 和 56% (IC<sub>50</sub> 為 22.7  $\pm$  3.6  $\mu$ M), 而 LY 294002 (10  $\mu$ M) 和 DPI (3  $\mu$ M) 分別有 31% 和 89% 的抑制程度(圖 2-14 (3))。此結果顯示抑制 PDK1/Akt 訊息傳遞途徑會影響超氧自由基的生成。

## 六、TCH 對 PKC 活化之影響

大鼠的嗜中性白血球中具有 PKC- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\theta$ 、 $\mu$ 、 $\iota/\lambda$  和  $\zeta$ , 且 PKC $\lambda$  和 PKC $\zeta$  含量很少 (Tsao and Wang, 1997)。到底是哪一個 PKC isoform 促進 p47<sup>phox</sup> 的磷酸化作用, 至今仍不確定。而在 cell-free 系統與 PKC isoforms 基因剔除 (knockout) 的 HL60 細胞與小鼠嗜中性白血球中, 發現 PKC- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$  與  $\zeta$  可參與 NADPH oxidase 的活化 (Reeves et al., 1999; Dang et al., 2001; Dekker et al., 2000; Brown et al., 2003; Korchak et al., 2007)。PKC 活化的最主要特徵是原本位於細胞質中的 PKC 會轉移至細胞膜。TCH 會抑制 PKC- $\alpha$  細胞膜轉移作用, 但卻不會抑制 PKC- $\beta$ 、 $\delta$  與  $\zeta$  的細胞膜轉移作用 (圖 2-15 (1))。PKC 與 p47<sup>phox</sup> 連結有助於對 p47<sup>phox</sup> 磷酸化。TCH 會抑制 PKC- $\alpha$ 、 $\delta$  與  $\zeta$  和 p47<sup>phox</sup> 的連結作用, 但是卻不會抑制 PKC- $\beta$  和 p47<sup>phox</sup> 的連結 (圖 2-15 (2))。當中的原因有待進一步探討。

利用 PKC activity assay kit 偵測 TCH 對 fMLP 促進 PKC 活性的影響, 顯示 PKC 活性並不會被 TCH 所抑制。而 PKC 抑制劑 GF 109203x (1  $\mu$ M) 可抑制 fMLP 所引起的 PKC 活性 (圖 2-15 (3))。但由於 PKC activity assay kit 所偵測的為所有 PKC isoform。因此, 究竟影響大鼠嗜中性球產生超氧自由基為哪一個 isoform, 需在經由對 PKC- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$  與  $\zeta$  具專一性的抑制劑加以探討。



## 七、TCH 對 p38 MAPK 和 MK2 磷酸化之影響

MAPKs 包括 ERK、p38 MAPK 和 JNK 三種。有文獻指出，p38 MAPK 與 ERK 可以促進 p47<sup>phox</sup> 的磷酸化作用 (El Benna et al., 1996)。但是，以抑制劑探究 p38 MAPK 和 ERK 在 fMLP 刺激超氧自由基生成的角色，卻發現只有 p38 MAPK 抑制劑 SB 203580 能抑制 fMLP 所引起的超氧自由基之生成作用，而 ERK 抑制劑 U0126 則無法抑制超氧自由基之生成 (Zu et al., 1998; Kuan et al., 2005)。MAPKs 的活化主要是來自於上游活化激酶一連串的磷酸化。活化 p38 MAPK 的磷酸化是受到上游激酶 MKK3/6 活化的作用，然後對下游的 MK-2 磷酸化並活化 (Krens et al., 2006)。本研究顯示，fMLP 可促進 p38 MAPK 與 MK-2 的磷酸化。SB 203580 能明顯地抑制 p38 MAPK 與 MK-2 的磷酸化作用，而 TCH 的濃度提高至 10  $\mu$ M 仍無法抑制 p38 MAPK 與 MK-2 的磷酸化 (圖 2-16)。此結果顯示 TCH 並沒有抑制 p38 的活性。在人類嗜中性白血球中，MK-2 被認為是 PDK2 (Rane et al., 2001; Burelout et al., 2007)，可對 Akt Ser473 進行磷酸化。p38 MAPK 與 MK-2 也被指出會促進 p47<sup>phox</sup> 的磷酸化作用。但是在大鼠嗜中性白血球中 MK-2 是否扮演 PDK2 的角色，以及 p38 MAPK 與 MK-2 是否可直接對 p47<sup>phox</sup> 磷酸化，仍有待進一步的研究。

## 八、TCH 對 PAK 磷酸化影響

活化的 Rac 可與 PAK 的 PBD domain 結合，促進 PAK 的活化 (Burbelo et al., 1995)。Rac 可藉由 PAK 活化對 p47<sup>phox</sup> 磷酸化 (Knaus et al., 1995)。第一類 PAK (包括 PAK1、PAK2 和 PAK3) 在 activation loop 結構上的 Thr423 磷酸化，對於 PAK 的活化極為重要 (Gatti et al., 1999)。TCH (10  $\mu$ M) 抑制 PAK1 和 PAK2 磷酸

化分別為 62%和 63% (IC<sub>50</sub> 值分別為 3.8 和 4.0 μM) (圖 2-17)。TCH 是否影響 PAK 的活性有待進一步的研究。

## 九、TCH 對 Vav 磷酸化影響

Vav 為 Rho-GEF 有三種 isoform (Vav1/2/3)。Vav 可經由 tyrosine 的磷酸化調節活性。在嗜中性白血球中，Vav 對 Rac 來說較為重要 (Kim et al., 2003)。TCH (3 μM 和 10 μM) 抑制 Vav (Tyr174) 磷酸化分別為 47% 和 68% (IC<sub>50</sub> 為 4.3 ± 3.0 μM)，而 Src kinase family 抑制劑 PP1 (10 μM) 有 94% 的抑制程度 (圖 2-18)。以結果顯示 TCH 可能經由抑制 Vav 磷酸化來降低 Rac 的活化，進而抑制 PAK 的活化。所以 Vav/Rac/PAK 傳遞途徑可能參與 TCH 抑制 p47<sup>phox</sup> 磷酸化的作用。

## 十、TCH 對細胞內 cyclic AMP 濃度之影響

已知增加細胞內 cyclic AMP 會抑制 fMLP 刺激嗜中性白血球超氧自由基的生成 (Cronstein et al., 1985)。TCH 不會影響嗜中性白血球細胞內 cyclic AMP 的含量。而已知的 β-adrenoceptor 促進劑 isoproterenol (3 μM) 可大量促進細胞內 cyclic AMP 的生成 (圖 2-19)。此結果顯示 TCH 不會經由增加 cyclic AMP 來抑制嗜中性白血球生成超氧自由基。

圖表(結果)

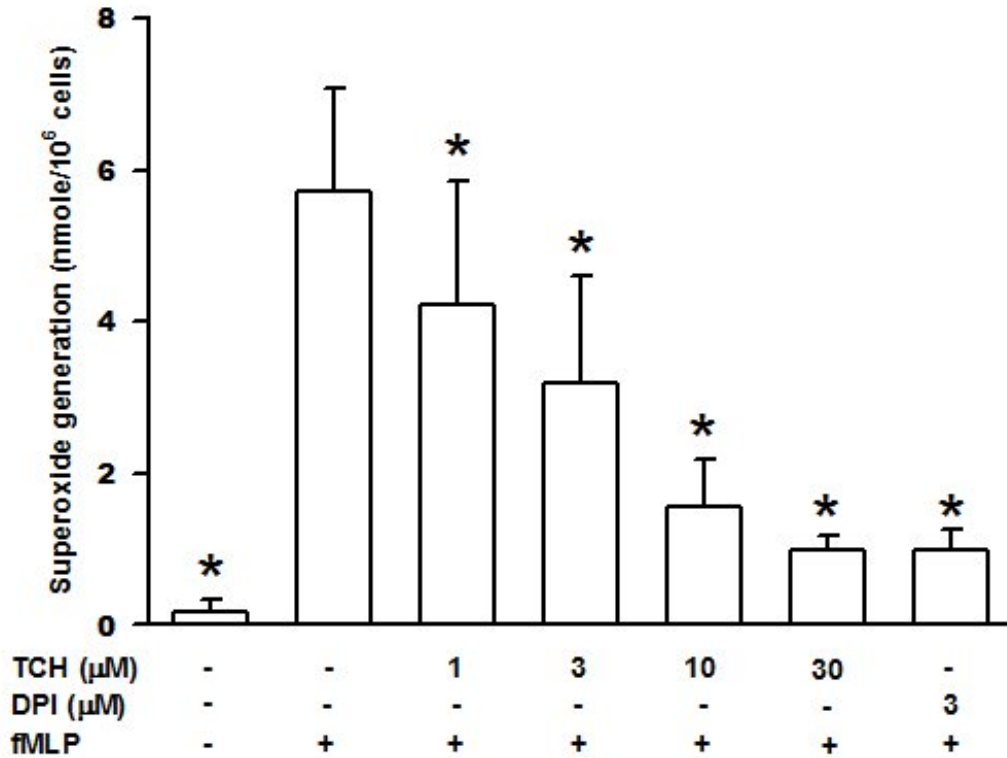


圖 2-1 TCH 抑制嗜中性白血球產生超氧自由基的濃度依存性

嗜中性白血球懸浮液 ( $2 \times 10^6$  cells/0.4 ml HBSS) 先與 cytochrome *c* (0.5 mg/ml)、cytochalasin B (5 μg/ml) 和  $\text{CaCl}_2$  (1 mM) 於試管中混合。在加入 DMSO、TCH 或 DPI 作用 5 分鐘後，以 1 μM fMLP 刺激細胞 10 分鐘，加入 100 U/ml SOD 中止反應。測量超氧自由基生成。數據以 mean  $\pm$  S.D. 表示 (N=5)。  
\*,  $p < 0.05$  與對照組(2nd column)比較。

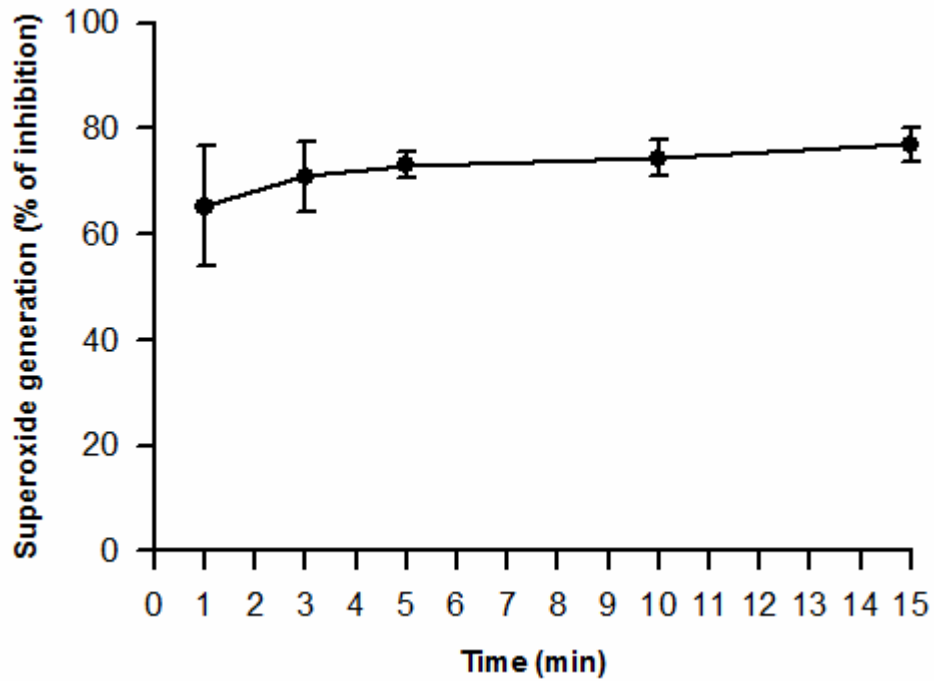


圖 2-2 TCH 抑制嗜中性白血球產生超氧自由基的時間依存性

嗜中性白血球先以 5  $\mu$ M TCH 處理不同時間，再以 1  $\mu$ M fMLP 刺激 10 分鐘後，加入 100 U/ml SOD 終止反應。測量超氧自由基生成。數據以 means  $\pm$  S.D. 值表示(N=4)。

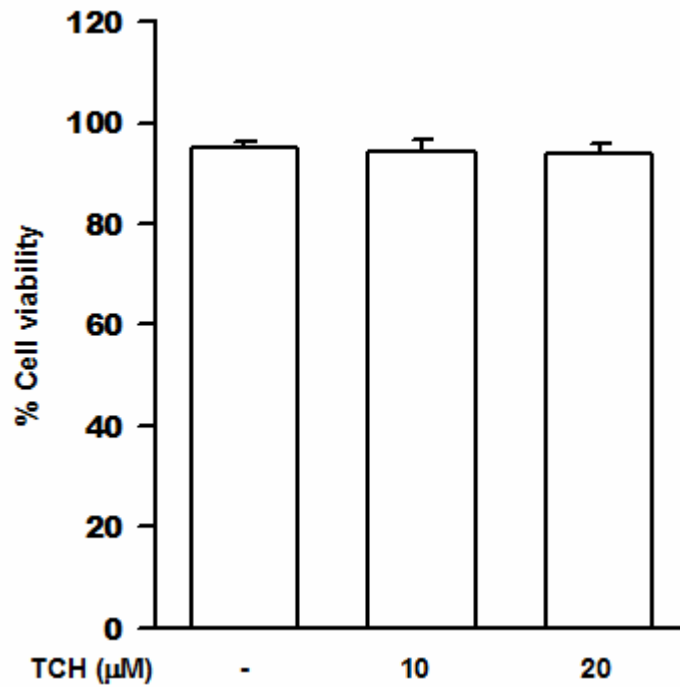


圖 2-3 TCH 對細胞存活率的影響

在嗜中性白血球懸浮液( $1 \times 10^6$  cells/0.5 ml)中加入 DMSO 或 TCH 處理 15 分鐘。細胞以 FDA 進行染色，再以 Flow cytometry 偵測螢光值之變化。細胞存活率是以 FDA positive 之細胞數與所有細胞數比值來計算。數據以 means  $\pm$  S.D. 值表示 (N=3)。

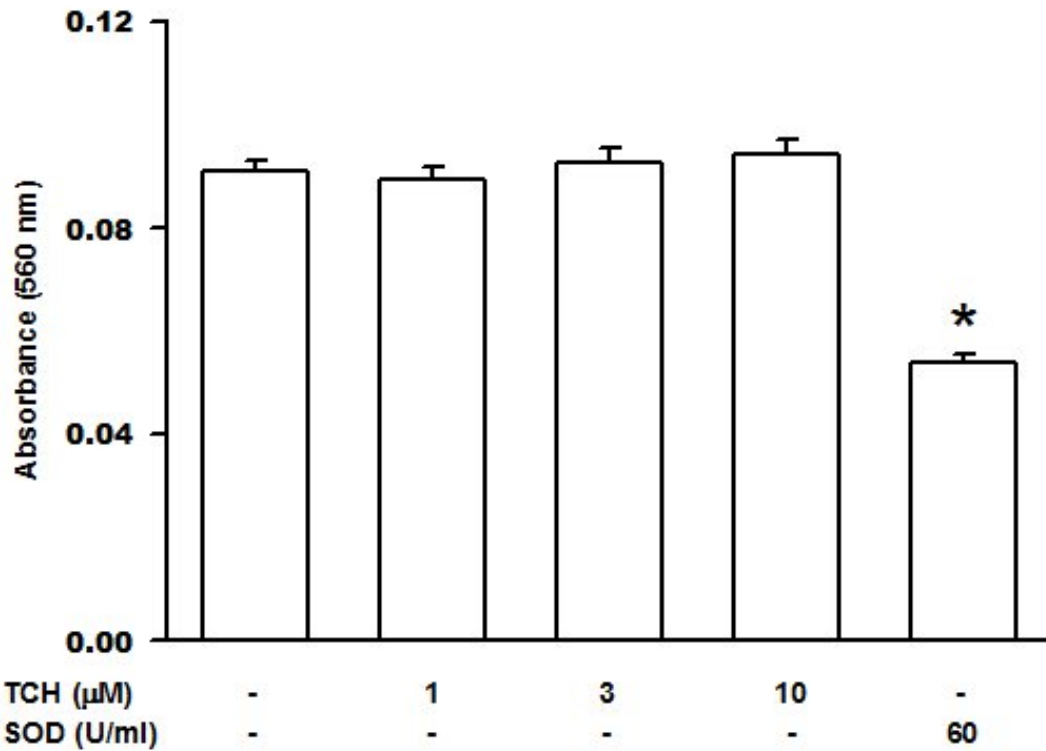


圖 2-4 TCH 對超氧自由基的清除作用

試管中含 0.891 mM DHF 及 0.274 mM NBT，以含有 SOD 作為對照組。加入 DMSO 或 TCH 室溫下反應 15 分鐘後，讀取 560 nm 吸光值的變化。數據以 means  $\pm$  S.D. 值表示 (N=4)。\*  $p < 0.05$ ，與對照組 (1st column) 比較。

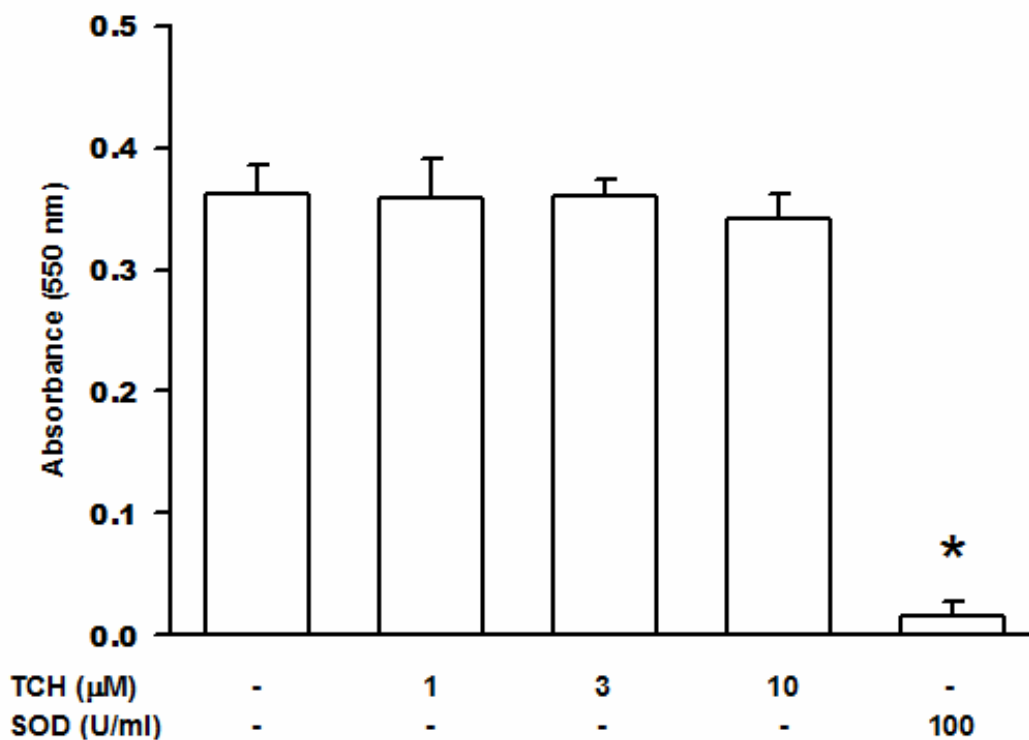
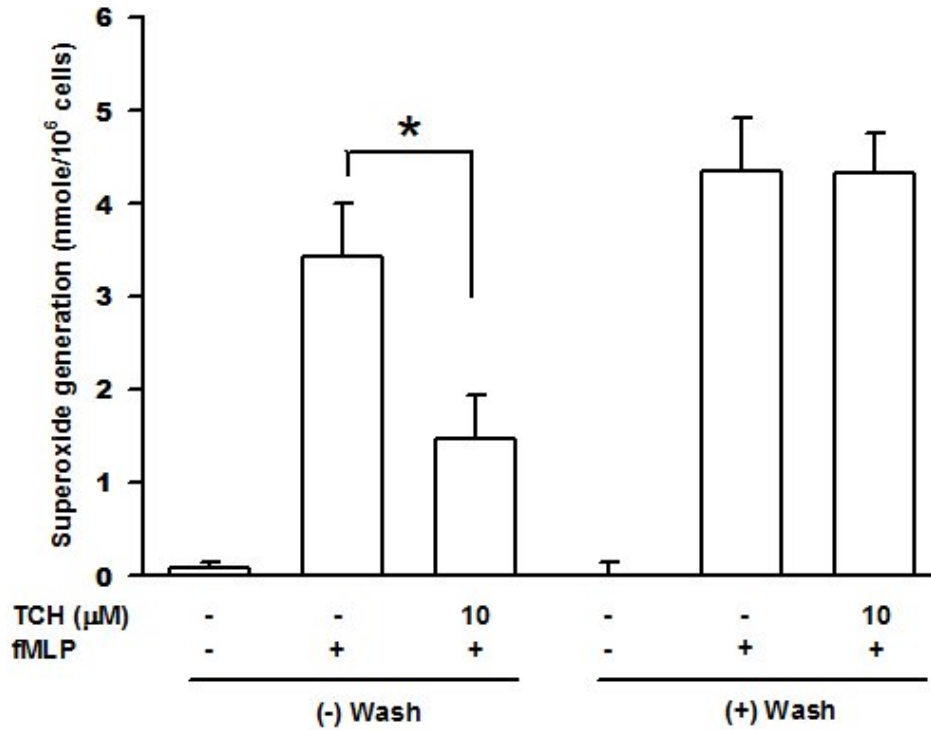


圖 2-5 TCH 對 xanthine-xanthine oxidase 產生超氧自由基的影響

將 phosphate buffer (pH 7.4) 中加入 20 mU/ml xanthine oxidase、ferricytochrome *c*、DMSO 或 TCH，以 0.15 mM xanthine 開啟反應，以分光光譜儀 550 nm 連續讀取 4 分鐘吸光值的變化。數據以 means ± S.D. 值表示 (N=3)。\*,  $p < 0.05$ ，與對照組 (1st column) 比較。



**圖 2-6 TCH 抑制 fMLP 刺激細胞產生超氧自由基之可逆性**

實驗組嗜中性白血球懸浮液 ( $2 \times 10^6$  cells/0.4 ml HBSS) 先與TCH或DMSO作用5分鐘，以HBSS清洗兩次。而對照組細胞懸浮液與TCH或DMSO作用5分鐘。兩組細胞懸浮液以  $1 \mu\text{M}$  fMLP 刺激細胞 10 分鐘，加入 100 U/ml SOD中止反應。測量超氧自由基生成。數據以  $\text{mean} \pm \text{S.D.}$  表示(N=3)。\*,  $p < 0.05$ 。



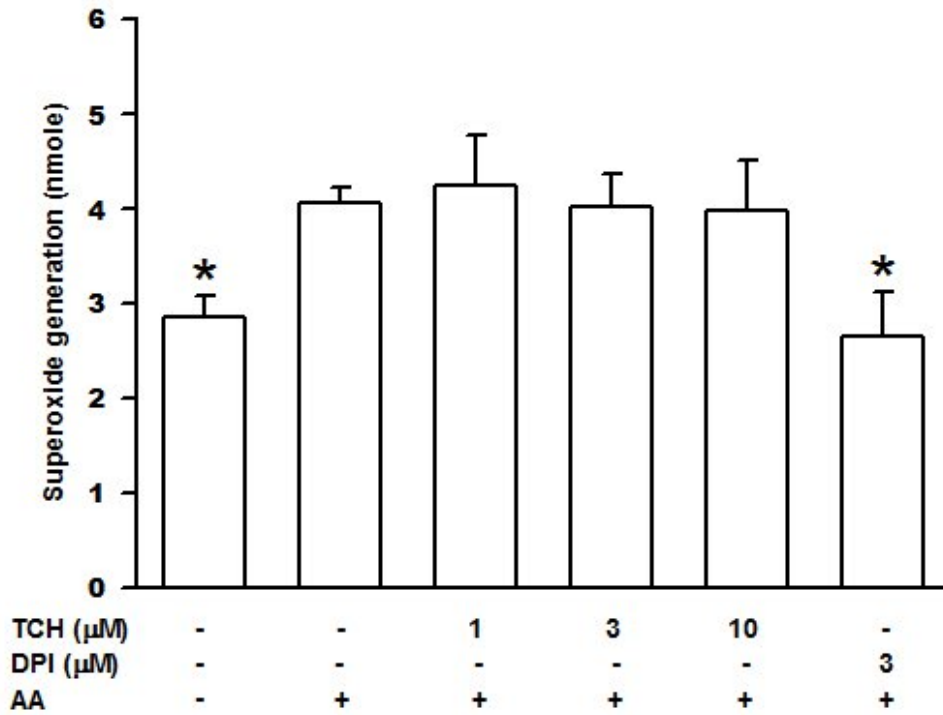


圖 2-7 TCH 對 cell-free 系統 NADPH oxidase 活性的影響

含嗜中性白血球細胞膜分劃 (50  $\mu\text{g}$ ) 及細胞質分劃 (250  $\mu\text{g}$ ) 的懸浮液，在 ferricytochrome *c* 存在下，加入 150  $\mu\text{M}$  AA 後，加入 DMSO、TCH 或 DPI 5 分鐘，以 200  $\mu\text{M}$  NADPH 開啟反應。測量超氧自由基生成。數據以 means  $\pm$  S.D. 值表示(N=4)。\*  $p < 0.05$ ，與對照組比較(2nd column)。

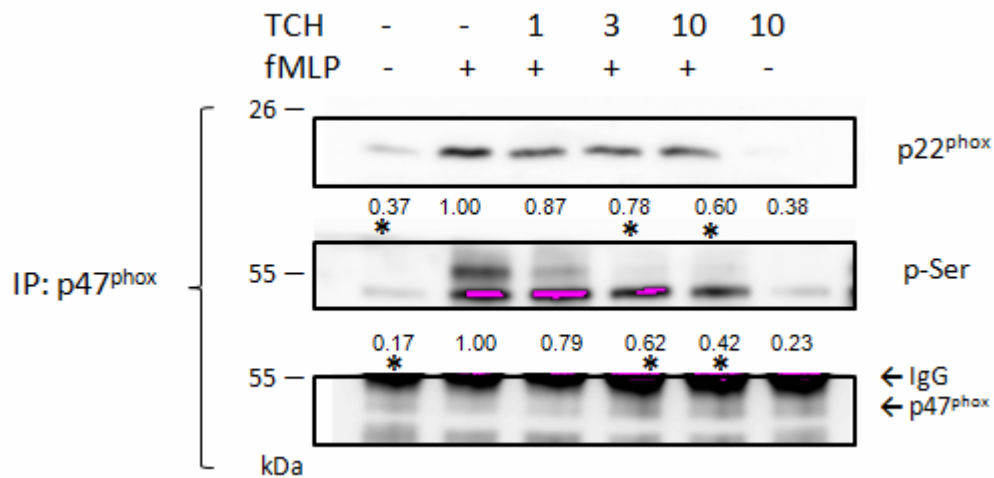
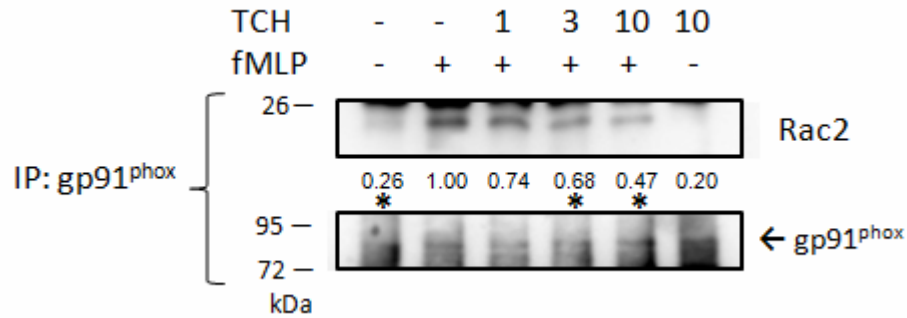


圖 2-8 TCH 對 fMLP 誘導 p47<sup>phox</sup> 活化之影響

嗜中性白血球先以 DMSO 或 TCH ( $\mu\text{M}$ ) 處理 5 分鐘，再以 1  $\mu\text{M}$  fMLP 刺激 1 分鐘後，萃取細胞蛋白質液，進行免疫沈澱法分離 p47<sup>phox</sup> 蛋白質，並以西方點墨法分析，分別利用 anti-p22<sup>phox</sup>、anti-phosphoserine 與 anti-p47<sup>phox</sup> 抗體進行偵測。數據以免疫冷光強度與對照組之平均比值(N=6)。\*  $p < 0.05$ ，與對照組(2nd lane)比較。

(1)



(2)

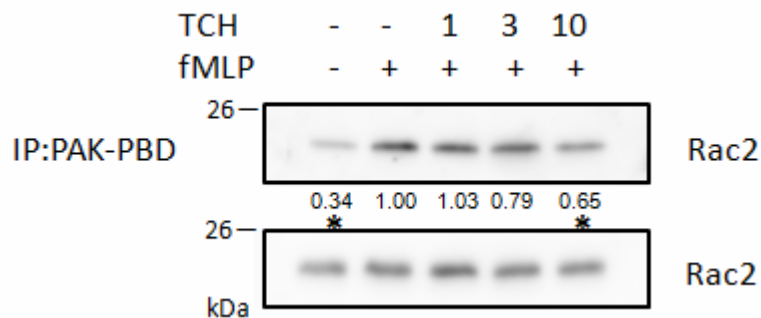
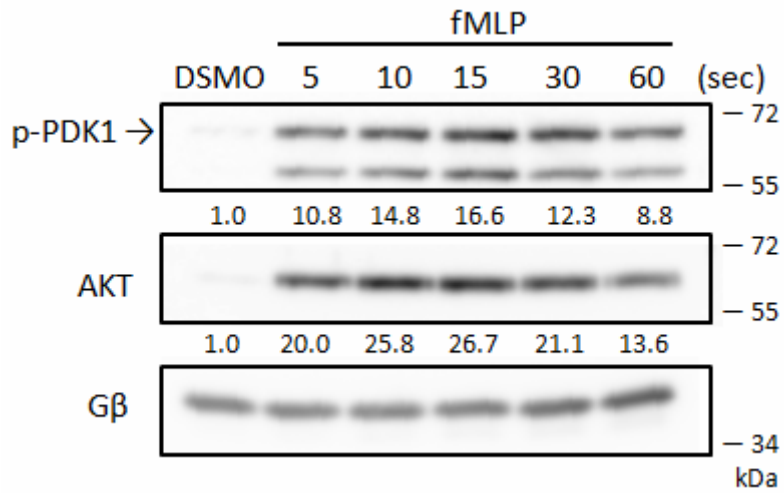


圖 2-9 TCH 對 fMLP 誘導 Rac2 活化之影響

嗜中性白血球先藥物處理 5 分鐘後，(1)以 fMLP 刺激 1 分鐘，萃取細胞蛋白質液，進行 anti-gp91<sup>phox</sup> 抗體免疫沈澱法，並以西方點墨法分析。數據以免疫冷光強度與對照組之平均比值(N=4)。\*  $p < 0.05$ ，與對照組(2nd lane)比較；(2) 以 fMLP 刺激 30 秒，萃取細胞蛋白質液，加入 PAK-PBD protein agarose beads 在 4°C 下，反應 1 小時。再以西方墨點法偵測 Rac2，且利用 total Rac2 細胞 lysate 作為 loading control。數據以免疫冷光強度與對照組之平均比值(N=4)。\*  $p < 0.05$ ，與對照組(2nd lane)比較。



**圖 2-10 fMLP 誘導 Akt 和 PDK1 細胞膜轉位的作用**

嗜中性白血球以 DMSO 或 1  $\mu$ M fMLP 刺激不同時間。以超音波打破細胞終止反應，取上清液進行超高速離心。細胞膜分割以西方墨點法偵測 Akt 和 PDK1。以 anti-G $\beta$  抗體辨識作為 loading control。數據以免疫冷光強度與對照組(1st column)之平均比值表示(N=3)。

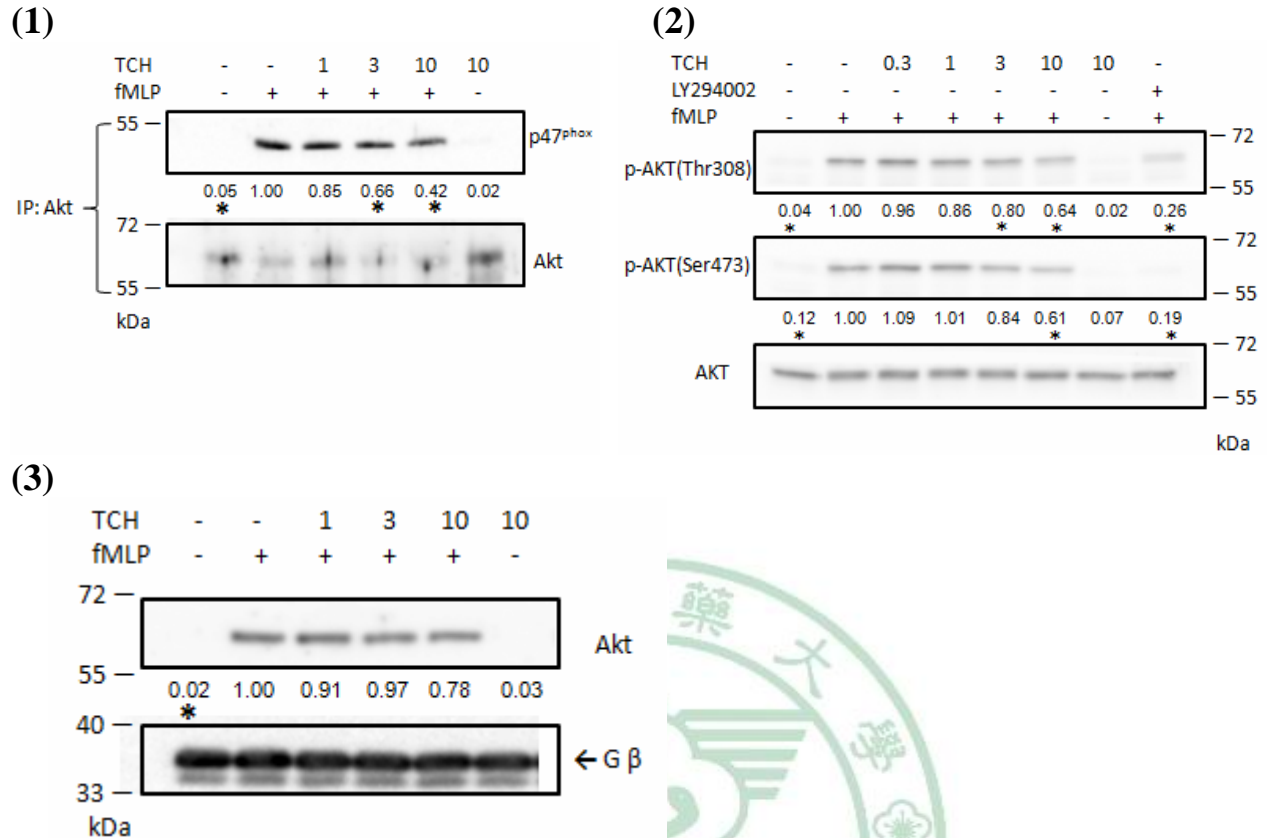


圖 2-11 TCH 對 Akt 磷酸化、細胞膜轉位以及與 p47<sup>phox</sup> 連結的影響

(1) 嗜中性白血球先以 DMSO 或 TCH ( $\mu\text{M}$ ) 處理 5 分鐘後，再以 1  $\mu\text{M}$  fMLP 刺激 30 秒，進行 anti-Akt 抗體免疫沈澱法，並以西方點墨法分析。數據以免疫冷光強度與對照組之平均比值(N=3)。\*  $p < 0.05$ ，與對照組(2nd lane)比較。(2) 細胞以 TCH 或 LY 294002 處理 10 分鐘，再以 fMLP 刺激 1 分鐘，並以西方點墨法偵測 phospho-Akt (Ser473)、phospho-Akt (Thr308) 和 Akt。數據以免疫冷光強度與對照組之平均比值(N=4)。\*  $p < 0.05$ ，與對照組(2nd lane)比較。(3) 細胞以 TCH 處理 5 分鐘，再以 1  $\mu\text{M}$  fMLP 刺激 15 秒。分離細胞膜分劃，以西方點墨法偵測 Akt。以 anti-G $\beta$  抗體辨識作為 loading control。數據以免疫冷光強度與對照組之平均比值(N=4)。\*  $p < 0.05$ ，與對照組(2nd lane)比較。

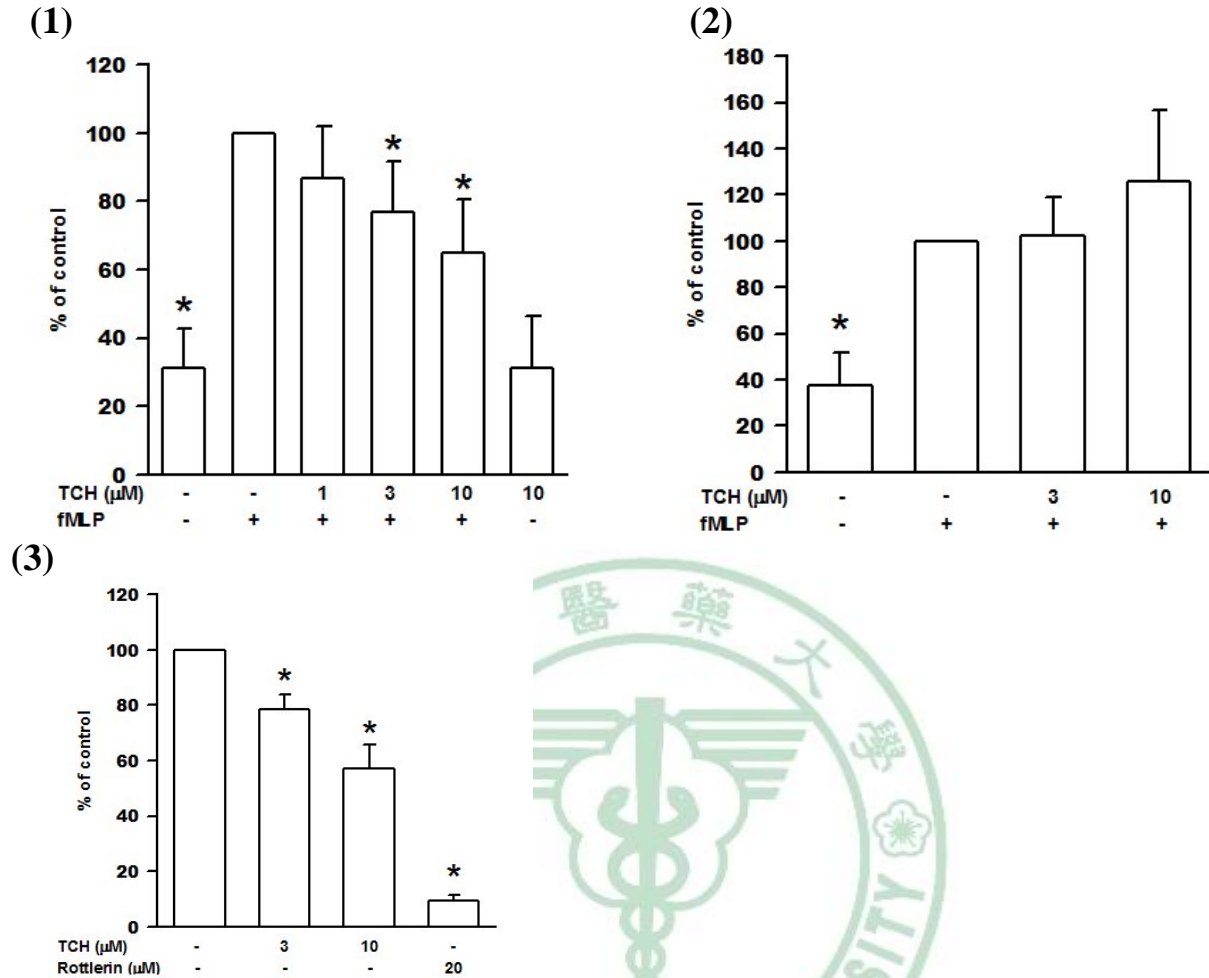


圖 2-12 TCH對Akt活化的影響

(1) 嗜中性白血球以 DMSO 或 TCH 處理 5 分鐘後，再以  $1 \mu\text{M}$  fMLP 刺激 1 分鐘，萃取細胞蛋白質液，以 Akt/PKB kinase activity assay kit 分析酵素活性。數據以 means  $\pm$  S.D. 值表示 (N=5)。\*  $p < 0.05$ ，與對照組 (2nd column) 比較。(2) 細胞以 DMSO 或 fMLP 刺激 1 分鐘。細胞蛋白萃取液以 DMSO 或 TCH 處理 5 分鐘，利用 Akt/PKB kinase activity assay kit 分析酵素活性 (N=3)。(3) 在  $30^\circ\text{C}$  下，active human recombinant Akt1 以 TCH 處理 5 分鐘或 rottlerin 處理 10 分鐘，以 Akt/PKB kinase activity assay kit 偵測其活性。數據以 means  $\pm$  S.D. 值表示 (N=3)。\*  $p < 0.05$ ，與對照組 (1st column) 比較。

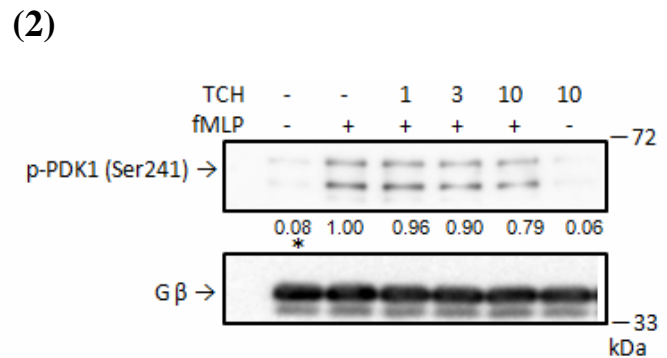
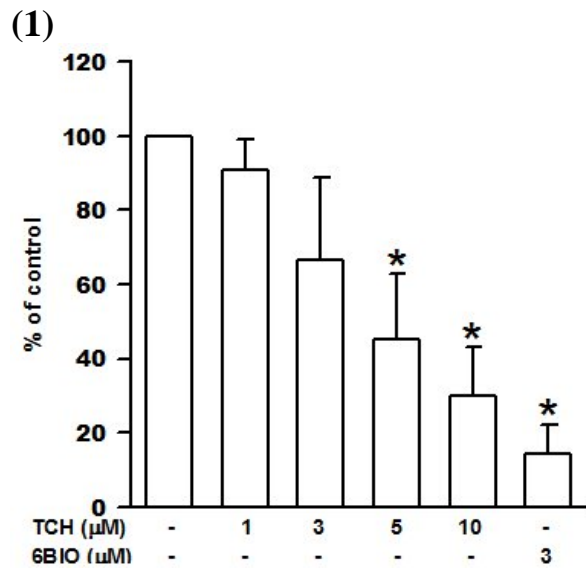
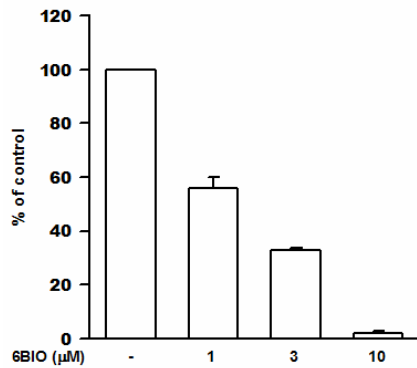


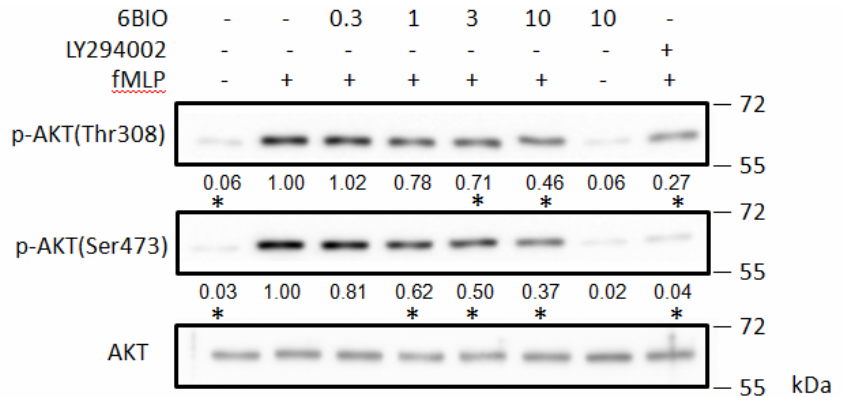
圖 2-13 TCH 對 PDK1 活化的影響

(1) Active human recombinant PDK1 以 TCH 或 3 μM 6BIO 在 30°C 下處理 5 分鐘，再以 PDK1 kinase activity assay kit 偵測活性。數據以 means ± S.D. 值表示 (N=4)。\* p < 0.05，與對照組(1st column)比較。(2) 嗜中性白血球以 TCH 前處理 5 分鐘，再以 1 μM fMLP 刺激 15 秒。分離細胞膜分割，以西方點墨法偵測 phospho-PDK1。同時利用 anti-G<sub>β</sub> 抗體辨識作為 loading control。數據以免疫冷光強度與對照組之平均比值(N=4)。\* p < 0.05，與對照組(2nd lane)比較。

(1)



(2)



(3)

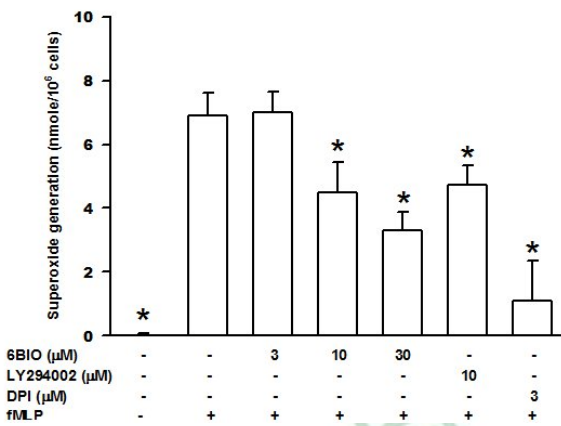
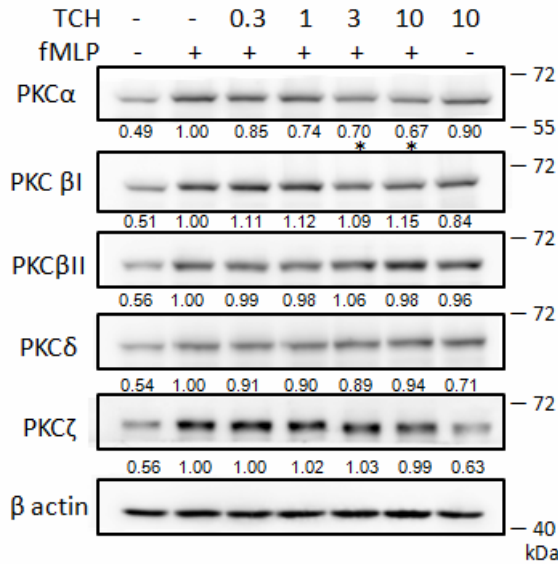


圖 2-14 6BIO對嗜中性白血球產生超氧自由基、Akt和PDK1活化的影響

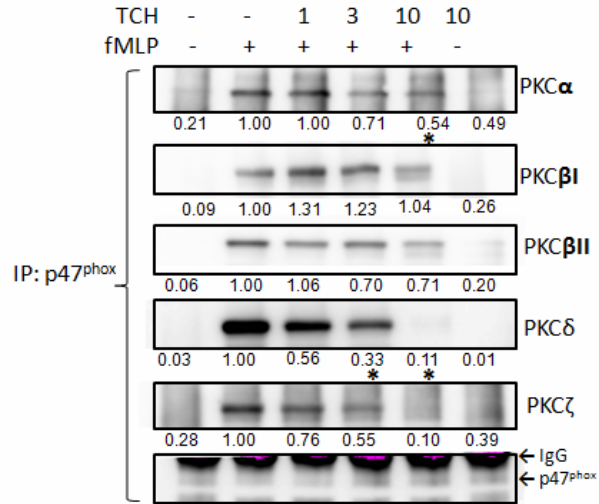
(1) Active human recombinant PDK1以6BIO在 30°C 下處理5分鐘，再以PDK1 kinase activity assay kit 偵測活性。數據以means ± S.D.值表示(N=2)。(2) 嗜中性白血球以6BIO處理5分鐘或LY 294002處理10分鐘，再以 1 µM fMLP刺激1分鐘。以西方點墨法偵測phospho-Akt (Ser473) 、phospho-Akt (Thr308) 和Akt。數據以免疫冷光強度與對照組之平均比值(N=4)。\*  $p < 0.05$ ，與對照組(2nd lane)比較。(3)嗜中性白血球懸浮液以6BIO、DMSO、DPI 或 LY 294002作用5分鐘後，以fMLP 刺激細胞 10 分鐘。測量超氧自由基生成。數據以mean ± S.D.表示(N=3)。\*,  $p < 0.05$ ，與對照組 (2nd column) 比較。



(1)



(2)



(3)

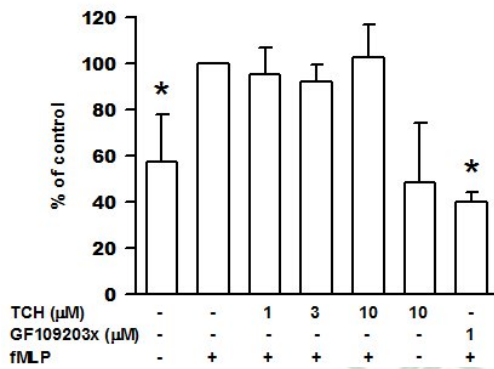


圖 2-15 TCH 對 PKC 活化的影響

嗜中性白血球以 TCH 處理 5 分鐘，再以 1 μM fMLP (1) 刺激 1 分鐘。分離細胞膜分劃，以西方點墨法偵測 PKC 和 β actin。數據以免疫冷光強度與對照組之平均比值(N=4)。\*  $p < 0.05$ ，與對照組(2nd lane)比較；(2)刺激 30 秒後，萃取細胞蛋白質液，進行 anti-p47<sup>phox</sup> 抗體免疫沈澱法，以西方點墨法分析。數據以免疫冷光強度與對照組之平均比值(N=4)。\*  $p < 0.05$ ，與對照組(2nd lane)比較。(3) 細胞先以 DMSO、TCH 處理或 GF109203X 處理後，再以 fMLP 刺激 1 分鐘，萃取細胞蛋白質液，以 PKC kinase activity assay kit 分析酵素活性。數據以 means ± S.D. 值表示(N=5)。\*  $p < 0.05$ ，與對照組(2nd column)比較。

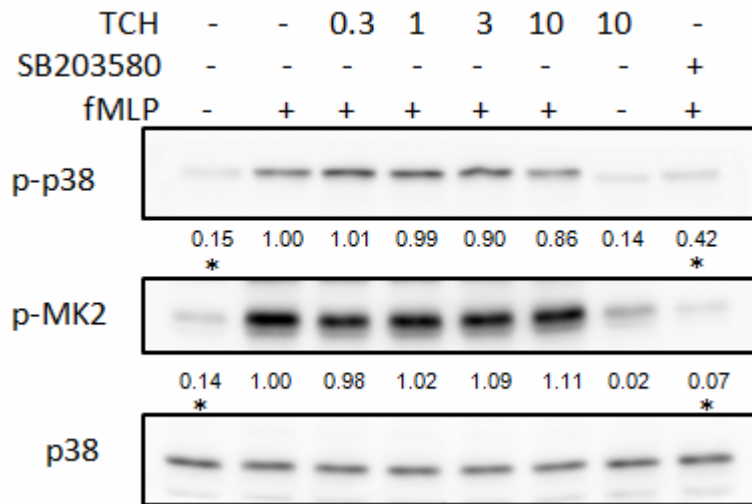


圖 2-16 TCH對p38 MAPK、MK2磷酸化的影響

嗜中性白血球 ( $5 \times 10^6$  cells)以TCH處理5分鐘或10  $\mu$ M SB 203580處理10分鐘，再以 1  $\mu$ M fMLP刺激1分鐘。以西方墨點法偵測phosph-p38、phosph-MK2和p38。數據以免疫冷光強度與對照組之平均比值(N=3)。\* $P < 0.05$ ，對照組 (2nd lane) 比較。

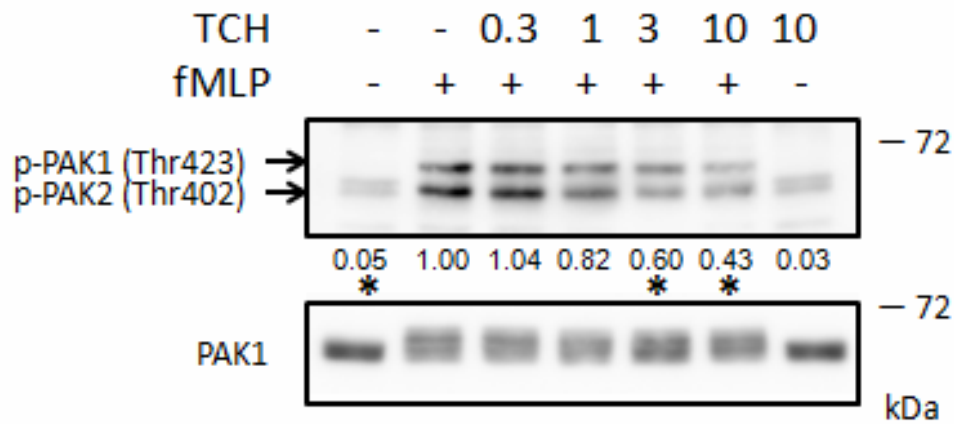


圖 2-17 TCH 對 PAK 磷酸化的影響

嗜中性白血球以 TCH 處理 5 分鐘，再以 fMLP 刺激 15 秒。以西方墨點法 anti-phospho-PAK1 (Thr423)/PAK2 (Thr402) 抗體偵測。轉漬膜再以 anti-PAK1 抗體偵測。數據以免疫冷光強度與對照組之平均比值(N=4)。\* $P < 0.05$ ，對照組(2nd lane)比較。

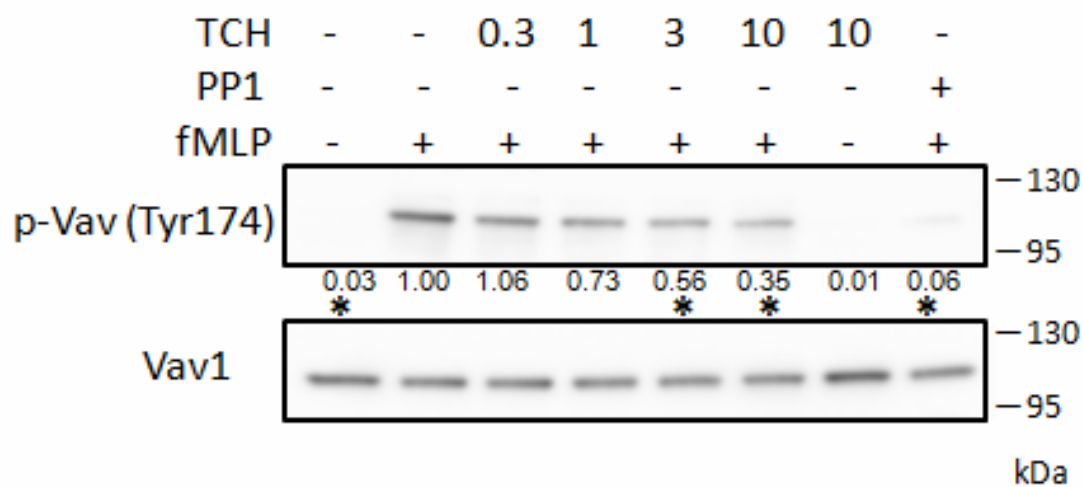


圖 2-18 TCH 對 Vav 磷酸化的影響

嗜中性白血球以 TCH 處理 5 分鐘或 10  $\mu$ M PP1 處理 10 分鐘，再以 fMLP 刺激 30 秒。進行西方點墨法並利用 anti-phospho-Vav (Tyr174) 抗體偵測。轉漬膜再以 anti-Vav1 抗體偵測。數據以免疫冷光強度與對照組之平均比值(N=4)。 $*P < 0.05$ ，對照組(2nd lane)比較。

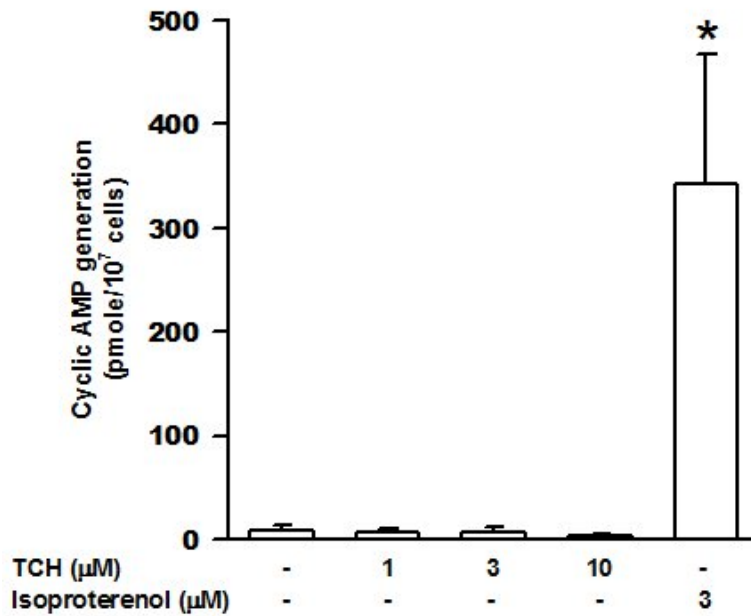


圖 2-19 TCH 對 cyclic AMP 生成的影響

嗜中性白血球以 DMSO、TCH 或 isoproterenol 處理後，吸取上清液，利用 cyclic AMP EIA kit 進行偵測。數據以 means ± S.D. 值表示 (N=3)。\* $p < 0.05$  與 DMSO 組(1st column)比較。

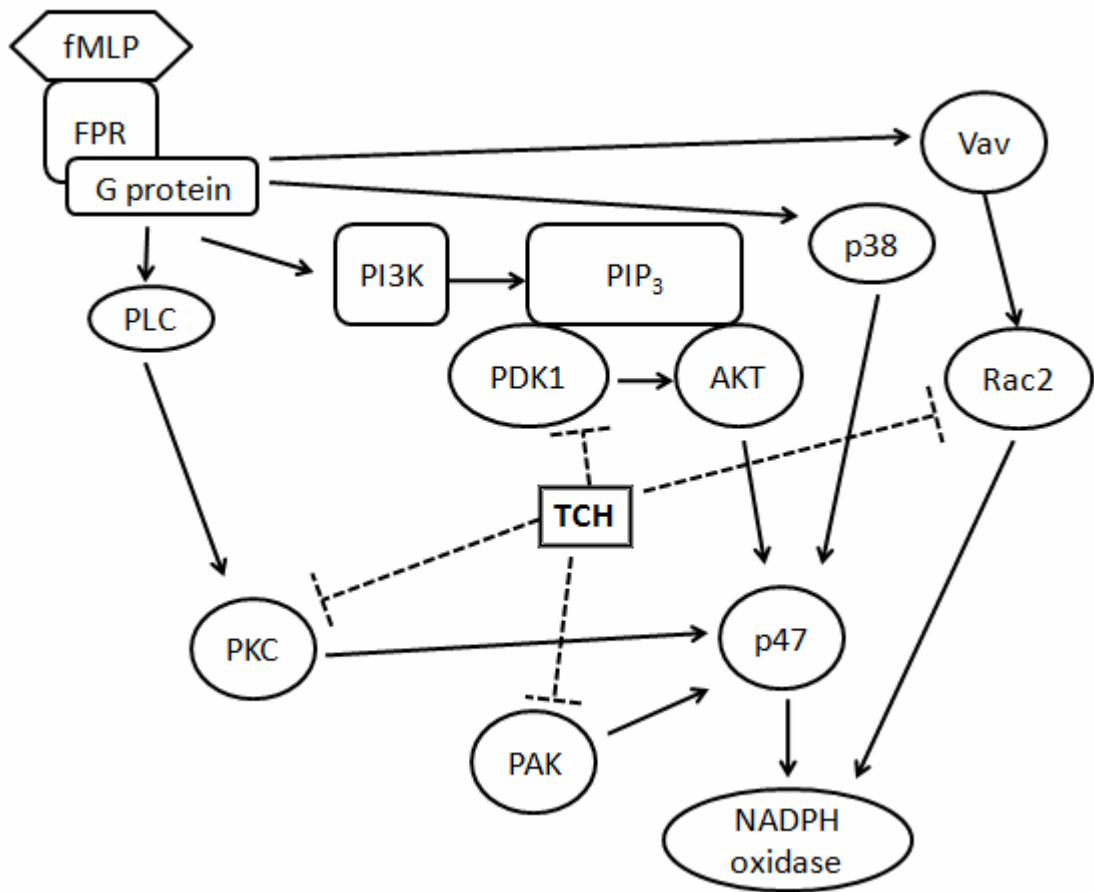


圖 2-20 結論



## 第五章 結論

新合成 phenazine carboxylate 類的化合物 TCH 可以抑制 fMLP 所誘導嗜中性白血球超氧自由基的生成。此抑制作用並非來自於影響細胞存活、超氧自由基清除或直接抑制 NADPH oxidase 的活性，可能是影響細胞內的訊息傳遞機制。而 p38 MAPK/MK-2 傳遞途徑及 cyclic AMP 可能並不參與 TCH 抑制超氧自由基生成的機制。TCH 可能經由影響 PDK1/Akt、PKC 和 PAK1 訊息傳遞途徑來抑制 p47<sup>phox</sup> 的磷酸化，經由影響 Vav/Rac2 訊息傳遞途徑來抑制 Rac2 的活化，進而抑制 NADPH oxidase 聚合及超氧自由基的生成 (圖 2-20)。TCH 可直接抑制 PDK1 的活性，而已知可直接抑制的 PDK1 的活性的藥物不多，TCH 有可能做為探討 PDK1 活性的工具用藥。



## 參考文獻

- Abo, A., Qu, J., Cammarano, M.S., Dan, C., Fritsch, A., Baud, V., Belisle, B., Minden, A. (1998) PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia. *EMBO J.* 17, 6527-6540.
- Ahmed, S., Prigmore, E., Govind, S., Veryard, C., Kozma, R., Wientjes, F.B., Segal, A.W., Lim, L. (1998) Cryptic Rac-binding and p21(Cdc42Hs/Rac)-activated kinase phosphorylation sites of NADPH oxidase component p67(phox). *J. Biol. Chem.* 273, 15693-15701.
- Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., Cohen, P. (1997) Characterization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr. Biol.* 7, 261-169.
- Andresen, B.T., Rizzo, M.A., Shome, K., Romero, G. (2002) The role of phosphatidic acid in the regulation of the Ras/MEK/Erk signaling cascade. *FEBS Lett.* 531, 65-68.
- Arias-Romero, L.E., Chernoff, J. (2008) A tale of two Paks. *Biol. Cell* 100, 97-108.
- Babior, B.M. (1998) Activation of the leukocyte NADPH oxidase by phorbol ester requires the phosphorylation of p47<sup>phox</sup> on serine 303 or 304. *J. Biol. Chem.* 273, 9539-9543.
- Babior, B.M., Curnutte, J.T., Kipnes, R.S. (1975) Biological defense mechanisms. Evidence for the participation of superoxide in bacterial killing by xanthine oxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 85, 235-244.
- Babior, B.M., Lambeth, J.D., Nauseef, W. (2002) The neutrophil NADPH oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 397: 342-344.
- Behn-Krappa, A., Newton, A.C. (1999) The hydrophobic phosphorylation motif of conventional protein kinase C is regulated by autophosphorylation. *Curr. Biol.* 9, 728-737.
- Bell, R.M., Burns, D.J. (1991) Lipid activation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 266, 4661-4664.
- Bengis-Garber, C., Gruener N. (1996) Protein kinase A downregulates the phosphorylation of p47<sup>phox</sup> in human neutrophils: a possible pathway for inhibition of the respiratory burst. *Cell Signal* 8, 291.
- Berridge, M.J., Irvine, R.F. (1989) Inositol phosphates and cell signaling. *Nature* 341,



197-205.

- Bokoch, G.M. (2003) Biology of the p21-activated kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 743-781
- Bokoch, G.M., Bohl, B.P., Chuang, T.H. (1994) Guanine nucleotide exchange regulates membrane translocation of Rac/Rho GTP-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 269, 31674-31679.
- Bokoch, G.M., Wang, Y., Bohl, B.P., Sells, M.A., Quilliam, L.A., Knaus, U.G. (1996) Interaction of the Nck adapter protein with p21-activated kinase (PAK1). *J. Biol. Chem.* 271, 25746-25749.
- Bornancin, F., Parker, P.J. (1997) Phosphorylation of protein kinase C- $\beta$  on serine657 controls the accumulation of active enzyme and contributes to its phosphatase-resistant state. *J. Biol. Chem.* 272, 3544-3549.
- Brechard, S., Tschirhart, E.J. (2008) Regulation of superoxide production in neutrophils: role of calcium influx. *J. Leukoc. Biol.* 84, 1223-1237.
- Brown, G.E., Stewart, M.Q., Liu, H., Ha, V.L., Yaffe, M.B. (2003) A novel assay system implicates PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, PtdIns(3)P, and PKC $\delta$  in intracellular production of reactive oxygen species by the NADPH oxidase. *Mol. Cell* 11, 35-47.
- Burbelo, P.D., Drechsel, D., Hall, A. (1995) A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. *J. Biol. Chem.* 270, 29071-29074.
- Burelout, C., Naccache, P.H., Bourgoin, S.G. (2007) Dissociation between the translocation and the activation of Akt in fMLP-stimulated human neutrophil-effects of prostaglandin E<sub>2</sub>. *J. Leukoc. Biol.* 81, 1523-1534.
- Burritt, J.B., Foubert, T.R., Baniulis, D., Lord, C.I., Taylor, R.M., Mills, J. S., Baughan, T.D., Roos, D., Parkos, C. A., Jesaitis, A.J. (2003) Functional epitope on human neutrophil flavocytochrome *b*<sub>558</sub>. *J. Immunol.* 170, 6082-6089.
- Casamayor, A., Morrice, N.A., Alessi, D.R. (1999) Phosphorylation of Ser-241 is essential for the activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1: identification of five sites of phosphorylation in vivo. *Biochem. J.* 342, 287-292.
- Chang, L.C., Wang, J.P. (1999) Examination of the signal transduction pathways leading to activation of extracellular signal-regulated kinase by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in rat neutrophils. *FEBS Lett.* 454, 165-168.
- Chang, L.C., Wang, J.P. (2000). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in rat neutrophils. *Eur. J. Pharmacol.* 390, 61-66.
- Chen, Q., Powell, D.W., Rane, M.J., Singh, S., Butt, W., Klein, J.B., McLeish, K.R.

- (2003) Akt phosphorylates p47<sup>phox</sup> and mediates respiratory burst activity in human neutrophils. *J. Immunol.* 170, 5302-5308.
- Chong, C., Tan, L., Lim, L., Manser, E. (2001) The mechanism of PAK activation. Autophosphorylation events in both regulatory and kinase domains control activity. *J. Biol. Chem.* 276, 17347-17353.
- Chuang, T.H., Bohl, B.P., Bokoch, G.M. (1993) Biologically active lipids are regulators of RacGDI complexation. *J. Biol. Chem.* 268, 26206-26211.
- Condliffe, A.M., Davidson, K., Anderson, K.E., Ellson, C.D., Crabbe, T., Okkenhaug, K., Vanhaesebroeck, B., Turner, M., Webb, L., Wymann, M.P., Hirsch, E., Ruckle, T., Camps, M., Rommel, C., Jackson, S.P., Chilvers, E.R., Stephens, L.R., Hawkins, P.T. (2005) Sequential activation of class IB and class IA PI3K is important for the primed respiratory burst of human but not murine neutrophils. *Blood* 106, 1432-1440.
- Cotteret, S., Chernoff, J. (2006) Nucleocytoplasmic shuttling of Pak5 regulates its antiapoptotic properties. *Mol. Cell Biol.* 26, 3215-3230.
- Coxon, P.Y., Rane, M.J., Uriarte, S., Powell, D.W., Singh, S., Butt, W., Chen, Q., McLeish, K.R. (2003) MAPK-activated protein kinase-2 participates in p38 MAPK-dependent and ERK-dependent functions in human neutrophils. *Cell Signal.* 15, 993-1001.
- Cronstein, B.N., Rosenstein, E.D., Kramer, S.B., Weissmann, G., Hirschhorn, R. (1985) Adenosine: a physiologic modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. Adenosine acts via an A2 receptor on human neutrophils. *J. Immunol.* 135, 1366-71.
- Dale, D.C., Boxer, L., Liles, W.C. (2008) The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 112, 935-945.
- Dang, P.M., Fontayne, A., Hakim, J., El Eenna, J., Perianin, A. (2001) Protein kinase C $\zeta$  phosphorylates a subset of selective sites of the NADPH oxidase component p47<sup>phox</sup> and participates in formyl peptide-mediated neutrophil respiratory burst. *J. Immunol.* 166, 1206-1213.
- Dang, P.M., Morel, F., Gougerot-Pocidallo, M.A., Benna, J.E. (2003) Phosphorylation of the NADPH oxidase component p67<sup>phox</sup> by ERK2 and p38MAPK: selectivity of phosphorylated sites and existence of an intramolecular regulatory domain in the tetratricopeptide-rich region. *Biochemistry* 42, 4520-4526.
- Daniel, R.H., Bokoch, G.M. (1999) p21-activated protein kinase: a crucial component of morphological signaling? *Trends Biochem. Sci.* 24, 350-355.
- Dekker, L.V., Leitges, M., Altschuler, G., Mistry, N., McDermott, A., Rose, J., Segal, A.W. (2000) Protein kinase C- $\beta$  contributes to NADPH oxidase activation in neutrophils. *Biochem. J.* 347, 285-289.

- Di Mari, J.F., Mifflin, R.C., Powell, D.W. (2005) The role of protein kinase C in gastrointestinal function and disease. *Gastroenterology* 128, 2131-2146.
- Didichenko, S.A., Tilton, B., Hemmings, B.A., Ballmer-Hofer, K., Thelen, M. (1996) Constitutive activation of protein kinase B and phosphorylation of p47<sup>phox</sup> by a membrane-targeted phosphoinositide 3-kinase. *Curr. Biol.* 6, 1271-1278.
- Edward, A.S., Faux, M.C., Scott, J.D., Newton, A.C. (1999) Carboxyl-terminal phosphorylation regulates the function and subcellular localization of protein kinase C  $\beta$ II. *J. Biol. Chem.* 274, 6461-6468.
- El-Benna J., Faust L.P., Babior B.M. (1994) The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47<sup>phox</sup> during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. *J. Biol. Chem.* 269, 23431-23436.
- El-Benna, J., Dang P.M., Gougerot-Pocidallo, M.A., Marie, J.C., Braut-Boucher, F. (2009) p47<sup>phox</sup>, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp. Mol. Med.* 41, 217-225.
- El-Benna, J., Faust, R.P., Johnson, J.L., Babior, B.M. (1996) Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47<sup>phox</sup> as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping, phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 6374-6378.
- Ellson, C.D., Gobert-Gosse, S., Anderson, K. E., Davidson, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Thuring, J.W., Cooper, M.A., Lim, Z.Y., Holmes, A.B. (2001) PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40<sup>phox</sup>. *Nat. Cell Biol.* 3, 679-682.
- English, J., Pearson, G., Wilsbacher, J., Swantek, J., Karandikar, M., Xu, S., Cobb, M.H. (1999) New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp. Cell Res.* 253, 255-270.
- Essen, L.O., Perisic, O., Cheung, R., Katan, M., Williams, R.L. (1996) Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C delta. *Nature* 380, 595-602.
- Fontayne, A., Dang, P.M., Gougerot-Pocidallo, M.A., El-Benna, J. (2002) Phosphorylation of p47<sup>phox</sup> sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22<sup>phox</sup> and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry* 41, 7743-7750.
- Fukami, K. (2002) Structure, regulation, and function of phospholipase C isozymes. *J. Biochem.* 131, 293-299.
- Furman, D.A., Meyer, R.E., Cantley, L.C. (1998) Phosphoinositide kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 481-507.
- Gao, T., Toker, A., Newton, A.C. (2001) The carboxyl terminus of protein kinase C

- provides a switch to regulate its interaction with the phosphoinositide-dependent kinase, PDK-1. *J. Biol. Chem.* 276, 19588-19596.
- Gatti, A., Huang, Z., Tuazon, P.T. and Traugh, J.A. (1999) Multisite autophosphorylation of p21-activated protein kinase gamma-PAK as a function of activation. *J. Biol. Chem.* 274, 8022-8028
- Goldberg, B., Stern, A. (1977) The role of the superoxide anion as a toxic species in the erythrocyte. *Arch. Biochem. Biophys.* 178, 218-225.
- Hale, K.K., Trollinger, D., Rihanek, M., Manthey, C.L. (1999) Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$  in inflammatory cell lineages. *J. Immunol.* 162, 4246-4252.
- Hallett, M.B., Pettit, E.J. (1997) Stochastic events underlie  $\text{Ca}^{2+}$  signalling in neutrophils. *J. Theor. Biol.* 186, 1-6.
- Hepler, J.R., Gilman, A.G. (1992) G proteins. *Trends Biochem. Sci.* 17, 383-387.
- Hideki, S. (2008) Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS Lett.* 275, 3249-3277.
- Hiroaki, H., Ago, T., Ito, T., Sumimoto, H., Kohda, D. (2001) Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain. *Nat. Struct. Biol.* 8, 526-530.
- Igarashi, K., Kanecla, M., Yamaji, A., Said, T., Kikkawa, U., On, Y., Inoue, K., Umeda, M. (1995) A novel phosphatidylserine-binding peptide motif defined by an anti-idiotypic monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* 270, 29075-29078.
- Inanami, O., Johnson, J.L., McAdara, J.K., El Benna, J., Faust, L.R., Newburger, P.E., Inoue, T., Meyer, T. (2008) Synthetic activation of endogenous PI3K and Rac identifies an AND-gate switch for cell polarization and migration. *PLoS One* 3, e3068.
- Jaffer, Z.M., Chernoff, J. (2002) p21-activated kinase: three more join the Pak. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 713-717.
- Johnson, G.L., Lapadat, R. (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912.
- Johnson, G.L., Lapadat, R. (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912.
- Johnson, J.L., Park, J.W., El Benna, J., Faust, L.R., Inanami, O., Babior, B.M. (1998) Activation of p47<sup>phox</sup>, a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase. Phosphorylation of ser359 or 370 precedes phosphorylation at other sites and is required for activity. *J. Biol. Chem.* 273, 35147-52.
- Kanai, F., Liu, H., Field, S., Akbary, H., Matsuo, T., Brown, G., Cantley, L., Yaffe, M. (2001) The PX domains of p47<sup>phox</sup> and p40<sup>phox</sup> bind to lipid products of PI(3)K. *Nat. Cell Biol.* 3, 675-678.

- Karathanassis, D., Stahelin, R.V., Bravo, J., Perisic, O., Pacold, C.M., Cho, W., Williams, R.L. (2002) Binding of the PX domain of p47<sup>phox</sup> to phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction. *EMBO J.* 21, 5057-5068.
- Katan, M. (1998) Families of phosphoinositide-specific phospholipase C: structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1436, 5-17.
- Kent, J.D., Sergeant, S., Burns, D.J., McPhail, L.C. (1996) Identification and regulation of protein kinase C- $\delta$  in human neutrophils. *J. Immunol.* 157, 4641-4647.
- Kim, C., Marchal, C.C., Penninger, J., Dinauer, M.C. (2003) The hemopoietic Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor Vav1 regulates N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-activated neutrophil function. *J. Immunol.* 171, 4425-4430.
- Kim, S., Jee, K., Kim, D., Koh, H., Chung, J. (2001) Cyclic AMP inhibits Akt activity by blocking the membrane localization of PDK1. *J. Biol. Chem.* 276, 12864-12870.
- Knaus, U.G., Morris, S., Dong, H.J., Chernoff, J., Bokoch, G.M. (1995) Regulation of human leukocyte p21-activated kinase through G protein-coupled receptors. *Science* 269, 221-223.
- Knaus, U.G., Wang, Y., Reily, A.M., Warnock, D., Jackson, J.H., (1998) Structural requirements for PAK activation by Rac GTPases. *J. Biol. Chem.* 273, 21512-21518.
- Koga, H., Terasawa, H., Nunoi, H., Takeshige, K., Inagaki, F., Sumimoto, H. (1999) Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67<sup>phox</sup> participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* 274, 25051-25060.
- Korchak, H.M., Dorsey, L.B., Li, H., Mackie, D., Kilpatrick, L.E. (2007) Selective roles for  $\alpha$ -PKC in positive signaling for O<sub>2</sub><sup>-</sup> generation and calcium mobilization but not elastase release in differentiated HL60 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1773, 440-449.
- Koyasu, S. (2003) The role of PI3K in immune cells. *Nat. Immunol.* 4, 313-319.
- Krens, S.F.G., Spaink, H.P., Snaar-Jagalska, B.E. (2006) Functions of the MAPK family in vertebrate-development. *FEBS Lett.* 580, 4984-4990.
- Kuan, Y.H., Ling, R.H., Tsao, L.T., Lin, C.N., Wang, J.P. (2005) Artocarpol A stimulation of superoxide anion generation in neutrophils involved the activation of PLC, PKC and p38 mitogen-activated PK signaling pathway. *Br. J. Pharmacol.* 145, 460-468.
- Kummer, J.L., Rao, P.K., Heidenreich, K.A. (1997) Apoptosis induced by withdrawal

- of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 272, 20490-20494.
- Kuribayashi F., Nunoi H., Wakamatsu K., Tsunawaki S., Sato K., Ito T., Sumimoto H. (2002) The adaptor protein p40<sup>phox</sup> as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. *EMBO J.* 21, 6312-6320.
- Kyriakis, J.M., Avruch, J. (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* 81, 807-869.
- Lei, M., Lu, W., Meng, W., Parrini, M.C., Eck, M.J., Mayer, B.J., Harrison, S.C. (2000) Structure of PAK1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch. *Cell* 102, 387-397.
- Majumdar, S., Kane, L.H., Rossi, M.W., Volpp, B.D., Nauseef, W.M., Korchak, H.M. (1993) Protein kinase C isotypes and signal-transduction in human neutrophils: selective substrate specificity of calcium-dependent beta-PKC and novel calcium-independent nPKC. *Biochim. Biophys. Acta* 1176, 276-286.
- Manser, E., Chong, C., Zhao, Z.S., Leung, t., Michael, G., Hall, G., Lim, L. (1995) Molecular cloning of a new member of the p21-Cdc42/Rac-activated kinase (PAK) family. *J. Biol. Chem.* 270, 25070-25078.
- Manser, E., Loo, T.H., Koh, C.G., Zhao, Z.S., Chen, X.Q., Tan, L., Tan, I., Leung, T. and Lim, L. (1998) PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Mol. Cell* 1, 183-192.
- Martyn, K.D., Kim, M.J., Quinn, M.T., Dinauer, M.C., Kanus, U.G. (2005) p21-activated kinase (Pak) regulates NADPH oxidase activation in human neutrophil. *Blood* 106, 3962-3969.
- Mira, J.P., Benard, V., Groffen, J., Sanders, L.C., Knaus, U.G. (2000) Endogenous, hyperactive Rac3 controls proliferation of breast cancer cells by a p21-activated kinase-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 185-189.
- Montserrat, C., Amanda, C., Petra, S., Alexander, S., Peter, J.P., Peter, G. (1992) Isozyme-selective stimulation of phospholipase C- $\beta$ 2 by G protein  $\beta\gamma$ -subunits. *Nature* 360, 684-689.
- Nathan, C. (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 173-182.
- Nauseef, W.M. (2004) Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochem. Cell Biol.* 122, 277-291.
- Newton, A.C. (1995) Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* 270, 28495-28498.
- Newton, A.C. (2003) Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem. J.* 370, 361-371.

- Nicholson, K.M., Anderson, N.G. (2002) The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell. Signal.* 14, 381-395.
- Nobuhisa, I., Takeya, R., Ogura, K., Ueno, N., Kohda, D., Inagaki, F., Sumimoto, H. (2006) Activation of the superoxide-producing phagocyte NADPH oxidase requires co-operation between the tandem SH3 domains of p47<sup>phox</sup> in recognition of a polyproline type II helix and an adjacent  $\alpha$ -helix of p22<sup>phox</sup>. *Biochem. J.* 396, 183-192.
- Okada, M., Ishimoto, T., Naito, Y., Hirata, H., Yagisawa, H. (2005) Phospholipase C $\delta_1$  associates with importin $\beta_1$  and translocates into the nucleus in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. *FEBS Lett.* 579, 4949-4954.
- oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J.* 275, 3249-3277.
- Park, H.S., Lee, S.M., Lee, J.H., Kim, Y.S., Bae, Y.S., Park, J.W. (2001) Phosphorylation of the leucocyte NADPH oxidase subunit p47<sup>phox</sup> by casein kinase 2: conformation-dependent phosphorylation and modulation of oxidase activity. *Biochem. J.* 358, 783-790.
- Puto, L.A., Pestonjamasp, K., King, C.C. Bokoch, G.M. (2003) p21-activated kinase 1 (PAK1) interacts with the Grb2 adapter protein to couple to growth factor signaling. *J. Biol. Chem.* 278, 9388-9393.
- Rabiet, M.J., Huet, E., Boulay, F. (2007) The N-formyl peptide receptors and the anaphylatoxin C5a receptors: an overview. *Biochimie.* 89, 1089-1106.
- Randriamampita, C., Tsien, R.Y. (1993) Emptying of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores releases a novel small messenger that stimulates Ca<sup>2+</sup> influx. *Nature* 364, 809-814.
- Rane, M.J., Coxon, P.Y., Powell, D.W., Webster, R., Klein, J.B., Pierce, W., Ping, P., McLeish, K.R. (2001) p38 Kinase-dependent MAPKAPK-2 activation function as 3-phosphoinositide-dependent kinase-2 for Akt in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 276, 3517-3523.
- Razzini, G., Brancaccio, A., Lemmon, M.A., Guarnieri, S., Falasca, M. (2000) The role of the pleckstrin homology domain in membrane targeting and activation of phospholipase C $\beta_1$ . *J. Biol. Chem.* 275, 14873-14881.
- Reeves, E.P., Dekker, L.V., Forbes, L.V., Wientjes, F.B., Grogan, A., Pappin, D.J., Segal, A.W. (1999) Direct interaction between p47<sup>phox</sup> and protein kinase C: Evidence for targeting of protein kinase C by p47<sup>phox</sup> in neutrophils. *Biochem. J.* 344, 859-866.
- Regier, D.S., Waite, K.A., Wallin, R., McPhail, L.C. (1999) A phosphatidic acid-activated protein kinase and conventional protein kinase C isoforms phosphorylate p22<sup>phox</sup>, an NADPH oxidase component. *J. Biol. Chem.* 274, 36601-36608.
- Rhee, S.G. (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu.*

- Rev. Biochem. 70, 281-312.
- Roos, D., Bruggen, R.V., Meischl, C. (2003) Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect.* 5, 1307-1315.
- Roux, P.P., Blenis, J. (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 320-344.
- Sarfstein, R., Gorzalczany, Y., Mizrahi, A., Berdichevsky, Y., Molshanski-Mor, S., Weinbaum, C., Hirshberg, M., Dagher, M.C., Pick, E. (2004) Dual role of Rac in the assembly of NADPH oxidase, tethering to the membrane and activation of p67<sup>phox</sup>: a study based on mutagenesis of p67<sup>phox</sup>-Rac1 chimeras. *J. Biol. Chem.* 279, 16007-16016.
- Sathyamoorthy, M., Mendez, I., Adams, A.G., Leto, T.L. (1997) p40<sup>phox</sup> down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain. *J. Biol. Chem.* 272, 9141-9146.
- Saunders, C.M., Larman, M.G., Parrington, J., Cox, L.J., Royse, J., Blayney, L.M., Swann, K., Lai, F.A. (2002) PLC zeta: A sperm-specific trigger of Ca<sup>2+</sup> oscillations in eggs and embryo development. *Development* 129, 3533-3544.
- Schudt, C., Winder, S., Forderkunn, S., Hatzelmann, A., Ullrich, V. (1991) Influence of selective phosphodiesterase inhibitors on human neutrophil functions and levels of cAMP and Cai. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 344, 682-690.
- Segal, A.W. (2005) How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 197-223.
- Selloum, L., Reichl, S., Muller, M., Sebihi, L., Arnhold, J. (2001) Effects of flavonols on the generation of superoxide anion radicals by xanthine oxidase and stimulated neutrophils. *Arch. Biochem. Biophys.* 395, 49-56.
- Shiose, A., Sumimoto, H. (2000) Arachidonic acid and phosphorylation synergistically induce a conformational change of p47<sup>phox</sup> to activate the phagocyte NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* 275, 13793-137801.
- Silinsky, E.M., Searl, T.J. (2003) Phorbol esters and neurotransmitter release: more than just protein kinase C? *Br. J. Pharmacol.* 138, 1191-1201.
- Simon, M.I., Strathmann, M.P., Gautam, N. (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252, 802-808.
- Soehnlein, O., Weber, C., Lindbom, L. (2009) Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends Immunol.* 30, 538-546.
- Spisani, S., Pareschi, M.C., Buzzi, M., Colamussi, M.L., Biondi, C., Traniello, S., Zecchini, G.P., Paradisi, M.P., Torrini, I., Ferretti, M.E. (1996) Effect of cyclic AMP level reduction on human neutrophil responses to formylated peptides. *Cell*



- Signal. 4, 269-77.
- Spitaler, M., Cantrell, D.A. (2004) Protein kinase C and beyond. *Nat. Immunol.* 5, 785-790.
- Stahelin, R.V., Burian, A., Bruzik, K.S., Murray, D., Cho, W. (2003) Membrane binding mechanisms of the PX domains of NADPH oxidase p40<sup>phox</sup> and p47<sup>phox</sup>. *J. Biol. Chem.* 278, 14469-14479.
- Stokoe, D., Campbell, D.G., Nakielny, S., Hidaka, H., Leever, S.J., Marshall, C., Cohen, P. (1992) MAPKAP kinase-2; a novel protein kinase activated by mitogen-activated protein kinase. *EMBO. J.* 11, 3985-3994.
- Stoyanov, B., Volinia, S., Hanck, T., Rubio, I., Loubtchenkov, M., Malek, D., Stoyanova, S., Vanhaesebroeck, B., Dhand, R., Nurnberg, B., Gierschik, P., Sedorf, K., Hsuan, J.J., Waterfield, M.D., Wetzker, R. (1995) Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase, *Science* 269, 690-693.
- Sumimoto, H. (2008) Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH that produce reactive oxygen species. *FEBS J.* 275, 3249-3277.
- Sumimoto, H., Miyano, K., Takeya, R. (2005) Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 677-686.
- Takeya, R., Sumimoto, H. (2003) Molecular mechanism for activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *Mol. Cells.* 16, 271-277
- Taylor, C.W. (1998) Inositol trisphosphate receptors: Ca<sup>2+</sup>-modulated intracellular Ca<sup>2+</sup>-channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1436, 19-33.
- Teresa, G., Salvador, A., Benitah, P. F., Valeron, C. E., Juan, C. L. (2005) Rho GTPase expression in tumourigenesis: evidence for a significant link. *BioEssays* 27, 602-613.
- Toker, A., Newton, A.C. (2000) Akt/Protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J. Biol. Chem.* 275, 8271-8274.
- 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, 1563-1577.
- Tsao, L.T., Wang, J.P. (1997) Translocation of protein kinase C isoform in rat neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234, 412-418.
- Vanhaesebroeck, B., Ali, K., Bilancio, A., Geering, B., Foukas, L.C. (2005) Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. *Trends Biochem. Sci.* 30, 194-204.

- Vanhaesebroek, B., Alessi, D.R. (2000) The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J.* 346, 561-576.
- Vanhaesebroek, B., Waterfield, M.D. (1999) Signal by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp. Cell Res.* 253, 239-254.
- Wang, J.P., Chang, L.C., Raung, S.L., Hsu, M.F., Huang, L.J., Kuo, S.C. (2002) Inhibition of superoxide anion generation by YC-1 in rat neutrophils through cyclic GMP-dependent and -independent mechanisms. *Biochem. Pharmacol.* 63, 577-585.
- Wang, J.P., Raung, S.L., Hsu, M.F., Lin, C.N. (1994) Inhibition by gmisin C (a lignan from *Schizandra Chinensis*) of the respiratory burst of rat neutrophils. *Br. J. Pharmacol.* 113, 945-953.
- Wing, M.R., Bourdon, D.M., Harden, T.K. (2003) PLC-epsilon: a shared effector protein in Ras-, Rho-, and G alpha beta gamma-mediated signaling. *Mol. Interv.* 3, 273-280.
- Wymann, M.P., Zvelebil, M., Laffargue, M. (2003) Phosphoinositide 3-kinase signalling-which way to target? *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 366-376.
- Wymann, M.P., Pirola, L. (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1436, 127-150.
- 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, 720-730.
- Yu, H., Suchard, S.J., Nairn, R., Jove, R. (1995) Dissociation of mitogen-activated protein kinase activation from the oxidative burst in differentiated HL-60 cells and human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 270, 15719-15724.
- Zahler, S., Tietze, S., Totzke, F., Kubbutat, M., Meijer, L., Vollmar, A.M., Apostolakis, J. (2007) Inverse in silico screening for identification of kinase inhibitor targets. *Chem. Biol.* 14, 1207-1214.
- Zenke, F.T., King, C.C., Bohl, B.P., Bokoch, G.M. (1999) Identification of a central phosphorylation site in p21-activated kinase regulating autoinhibition and kinase activity. *J. Biol. Chem.* 274, 32565-32573.
- Zu, Y.L., Qi, J., Gilchrist, A., Fernandez, G.A., Vazquez-abad, D., Kreutzer, D.L., Huang, C.K. Shaafi, R.I. (1998) p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for human neutrophil function triggered by TNF- $\alpha$  or FMLP stimulation. *J. Immunol.* 160, 1982-1989.