

DISS. ETH NO. 22630

Structural and Functional Characterization of Isolated Oxidized Phospholipid Derivatives

A thesis submitted to attain the degree of:
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by:
PETER BRETSCHER

MSc ETH Biology
born on 03.04. 1981

citizen of Zurich (ZH)

accepted on the recommendation of:

Prof. Dr. Manfred Kopf, examiner
Dr. Stefan Freigang, co-examiner
Prof. Sabine Werner, co-examiner
Prof. Christian Wolfrum, co-examiner

2015

1. Summary

Oxidative stress reflects a homeostatic imbalance between the accumulation of detrimental chemical modifications inflicted to biological systems by highly reactive oxygen species and the capacity of the biological system to adequately respond to these insults in order to restore homeostatic balance. However, exposure to reactive oxygen species (ROS) continuously happens under homeostasis and cells have therefore evolved intricate defense mechanisms to counteract such disturbances and to keep redox balance within a range suitable to sustain life. It is well appreciated that increased oxidative stress is involved in the pathogenesis of chronic inflammatory diseases, metabolic disorders and cancer. During oxidative stress, the polyunsaturated fatty acids (PUFAs) of membrane phospholipids are readily modified by reactive oxygen intermediates, a process which yields a variety of distinct, biologically active oxidized phospholipid species (OxPL). These have been demonstrated at sites of infection and inflammation *in vivo* and their ability to modulate cellular signaling processes is now increasingly recognized. However, the identity of individual OxPL species and the molecular mechanisms underlying their signaling remain poorly understood.

Here we investigated the biological activities as well as the structural and functional characteristics of anti-inflammatory lipid mediators contained within complex aggregates of OxPL. We focused on 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PAPC) because it represents the most abundant phospholipid and modification products hereof have been implicated in the pathogenesis of a variety of diseases. PAPC contains the saturated palmitic acid at the *sn*-1 position as well as the unsaturated arachidonic acid located at the *sn*-2 position that is prone to extensive oxidative modification. We performed several different *in vitro* oxidation protocols to yield a large variety of different oxidation products (OxPAPC).

These complex mixtures of OxPAPC potently inhibited the TLR-induced pro-inflammatory cytokine secretion in myeloid cells. The suppressive effect on cytokine secretion was not dependent on a specific TLR agonist as stimulation of cells with cognate ligands of TLR 2,3,4,7 and 9 could all be modulated by OxPAPC pre-treatment. The detection of reduced cytokines in cell culture supernatant was not

the result of a secretory defect as the mRNA transcripts showed a decreased expression upon OxPL treatment.

Furthermore, these lipids held the potential to license dendritic cells to interfere with high dose antigen driven Th1 polarization of naïve CD 4 T cells and to promote Th2 polarization instead. Performing mass spectrometric analysis of OxPAPC mixtures displaying varying bioactivity, we were able to correlate the abundance of certain oxidized lipid species in a given mixture with the inhibitory effect of the same mixture on cytokine secretion.

Highly pure chemically synthesized candidate lipids were then tested separately in various bioassays and revealed isoprostane-containing 1-palmitoyl-2-(5,6-epoxyisoprostane-E2)-sn-glycero-3-phosphocholine (PEIPC) and the cyclopentenone compound 1-palmitoyl-2-(5,6-epoxyisoprostane-A2)-sn-glycero-3-phosphocholine (PECPC) as the major specimens mimicking the anti-inflammatory effects observed with complex mixtures of OxPAPC. These two modified lipids share common structural properties with endogenous prostaglandin-derived 15-deoxy-D12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2), which is known to possess strong anti-inflammatory characteristics but occurs in an un-esterified free fatty acid form in nature. We therefore speculated whether un-esterified variants of PEIPC and PECPC, termed epoxyisoprostane (EI) and epoxycyclopentenone (EC) respectively, would retain their bioactivity. Indeed, the free fatty acid forms EI and EC were an order of magnitude more potent than their phospholipid associated counterparts. Structure-function investigations of variants of EC with selectively reduced electrophilic sites highlighted the importance of the cyclopentenone structure as well as a nearby epoxide group for the observed bioactivity. Examination of the chemical properties of EC, the most potent modification product investigated so far, let us to speculate that this molecule itself might represent an intermediate species that under physiological pH conditions would react to a cyclized lactone end product that we termed cyclo-EC (cEC). Notably cEC revealed an unprecedented anti-inflammatory potency as compared to the previously described OxPL species.

Testing our lipids on various genetic backgrounds identified Nrf2, a master regulator of the anti-oxidant response, as the primary mediator of the suppressive effect on pro-inflammatory cytokine secretion. Treatment of dendritic cells and macrophages

with OxPAPC and isolated components EC and cEC induced potent transcription of Nrf2 downstream target genes Hmox1, Nqo1, Gclc and Gsta3 in vitro and in vivo.

In a model of LPS induced lung injury we could show that pre-treatment with EC and cEC decreased infiltration of inflammatory cells into lung and broncho-alveolar space. Furthermore treatment with EC suppressed LPS induced lung vascular inflammation assessed by a decreased number of adherent inflammatory cells to the lung vascular wall.

Lastly, in a model of *L. monocytogenes* infection we were able to show interference of Listeria clearance by pre-treatment with OxPL, EC or cEC that was associated with a decrease of pro-inflammatory cytokine secretion and the disappearance of a population of CD11b⁺F4/80^{hi} macrophages subset in the peritoneal cavity.

Taken together, our results suggest that non-enzymatic oxidation processes are involved in the generation of modified lipid species with potent anti-inflammatory properties. With this study we provide some insight into the chemical identity of OxPL species that act to suppress signaling events underlying inflammatory processes and we discriminate them from the bulk material that does not mediate such effects by highlighting fundamental differences in structural characteristics. Furthermore we identified a previously unknown oxidative modification product of arachidonic acid with potent anti-inflammatory and cytoprotective activity that might represent a therapeutic compound for the treatment of inflammatory disease.

2. Zusammenfassung

Aus physiologischer Sicht entsteht oxidativer Stress aus einem homöostatischen Ungleichgewicht resultierend einerseits aus der Anreicherung von hoch reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und den dadurch verursachten Schädigungen in einem biologischen System und andererseits aus der Fähigkeit des Systems diese Schäden zu neutralisieren und das Gleichgewicht wieder herzustellen. Da Organismen jedoch ständig einer geringen Menge von reaktiven Sauerstoffmolekülen (ROS) ausgesetzt sind, haben sie komplexe Strategien entwickelt um diese potentiellen Schädigungen zu beseitigen und das Redox-Gleichgewicht innerhalb eines Bereiches zu erhalten, welcher das Leben, wie wir es kennen, ermöglicht. Heutzutage geht man davon aus, dass oxidativer Stress eine zentrale Rolle in der Entstehung von chronischen entzündlichen Krankheiten sowie Stoffwechselstörungen oder Krebs führen kann. Unter dem Einfluss von erhöhtem oxidativem Stress werden vor allem mehrfach ungesättigte Fettsäuren in Phospholipiden oxidiert, welche sich in allen zellulären Membranen befinden. Dies führt zur Entstehung einer Vielzahl von unterschiedlichen, aber biologisch aktiven, oxidierten Phospholipiden (OxPL). Besonders an entzündeten oder infizierten Stellen entstehen diese OxPL in erhöhtem Ausmass. Die molekularen Wirkmechanismen welche dieser biologischen Aktivität zugrunde liegen, so wie die chemische Struktur dieser OxPL sind jedoch noch immer nicht vollständig erforscht.

Wir haben deshalb die biologischen Aktivitäten und die chemischen Eigenschaften von anti-entzündlichen Lipidmediatoren, welche sich in solchen OxPL-Gemischen befinden, näher untersucht. Zu diesem Zweck haben wir uns auf das Phospholipid 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PAPC) fokussiert, da es eines einerseits sehr häufig auftritt und andererseits bekannt ist, dass davon abgeleitete oxidativ modifizierte Verbindungen in der Entstehung einer Reihe von Krankheiten involviert sind. PAPC beinhaltet zwei verschiedene Fettsäuren. Einerseits eine gesättigte Palmitinsäure und andererseits eine ungesättigte Arachidonsäure welche anfällig für oxidative Modifikationen ist. Dieses PAPC haben wir mit verschiedenen Oxidations-Protokollen *in vitro* modifiziert um eine Bandbreite von unterschiedlichen Oxidationsprodukten zu erhalten.

Diese komplexen Mischungen inhibierten die Toll-like Rezeptor (TLR) induzierte Produktion der entzündlichen Zytokine IL-6 und IL-12 in verschiedenen Zellen myeloider Abstammung. Die Unterdrückung der Zytokinproduktion war nicht von einem spezifischen TLR abhängig da entzündliche Reaktionen induziert durch TLR 2,3,4,7 und 9 ebenso supprimiert werden konnten. Diese Reduktion war nicht ein sekundärer Effekt durch eine verhinderte Sekretion, da auch die entsprechenden mRNA Transkripte reduziert waren.

Des Weiteren veranlasste eine Behandlung von dendritischen Zellen mit OxPL diese, naive T-Zellen zu Th2-Zellen zu polarisieren statt zu Th-1 Zellen, was unter hoch dosierter Antigen Gabe normalerweise beobachtet wird.

Mit Hilfe von massenspektrometrischen Analysen korrelierten wir die Häufigkeit einzelner Bestandteile von OxPAPC Mischungen mit der Fähigkeit selbiger Mischungen entzündliche Reaktionen zu unterdrücken.

Die dadurch ermittelten Lipidkandidaten wurden dann einzeln in verschiedenen Bioassays getestet und es zeigte sich, dass die isoprostanoide Lipide 1-palmitoyl-2-(5,6-epoxyisoprostan-E2)-sn-glycero-3-phosphocholine (PEIPC) und 1-palmitoyl-2-(5,6-epoxyisoprostan-A2)-sn-glycero-3-phosphocholine (PECPC) für die anti-entzündlichen Eigenschaften der Mischungen ursächlich waren. Die beiden so identifizierten Verbindungen zeigten ähnliche Eigenschaften wie das endogene, von Prostaglandinen abgeleitete Produkt 15-deoxy-D12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2), welches ebenfalls starke anti-entzündliche Eigenschaften aufweist, jedoch im Gegensatz zu den identifizierten Lipiden keinen Phospholipid-Rest mehr trägt. Wir wollten deshalb untersuchen, ob PEIPC und PECPC ihre biologischen Eigenschaften behalten würden, wenn sie vom Phospholipid-Rest getrennt würden. Diese Verbindungen, welche Epoxyisoprostan (EI) und Epoxycyclopentenon (EC) genannt werden, waren eine Zehnerpotenz stärker als die ursprünglichen Lipide mit Phospholipid-Rest. Untersuchungen zur Relation zwischen Struktur und Funktion, basierend auf Varianten von EC mit selektiv reduzierten elektrophilen chemischen Gruppen, zeigten, dass sowohl die Zyklopentenon-Struktur als auch die Epoxid-Gruppe wichtig für die biologische Funktion dieses Moleküls sind. Weiterhin zeigte sich, dass EC, die potenteste Verbindung, selber nur ein Intermediat darstellt und dass es unter physiologischem pH zum Lakton-Produkt Zyklo-EC (cEC) weiterreagiert. Interessanterweise hatte diese Verbindung noch stärkere

antientzündliche Eigenschaften als die zuvor beschriebenen Lipide. Durch Untersuchungen dieser Lipid-Effekte auf unterschiedlichen genetischen Backgrounds, identifizierten wir Nrf2, einen wichtigen Regulator von anti-oxidativen Reaktionen, als den hauptsächlichen Vermittler der supprimierenden Effekte von OxPL-Produkten auf die Produktion von entzündlichen Zytokinen. Makrophagen und dendritische Zellen, welche mit diesen Lipiden behandelt wurden, zeigten eine starke Heraufregulierung der Gene Hmox1, Nqo1, Gclc und Gsta3 welche von Nrf2 gesteuert werden in vitro als auch in vivo. Gabe von EC und cEC schwächen eine LPS-induzierte Infiltration von entzündlichen Zellen in die Lunge und den Bronchoalveolar-Raum ab. Ausserdem inhibierte die Behandlung mit EC vaskuläre Entzündung in der Lunge und damit zusammenhängend die Adhäsion von entzündlichen Zellen an pulmonalen Blutgefäßen. Behandlung mit OxPAPC, EC und cEC inhibierte ausserdem die Beseitigung von *Listeria monocytogenes* nach Infektion, einhergehend mit einer verringerten Produktion von anti-entzündlichen Zytokinen und dem Verschwinden einer Population von CD11b⁺F4/80^{hi} Makrophagen aus dem Peritonealraum.

Zusammengefasst zeigen unsere Resultate, dass durch nicht-enzymatische Oxidationsprozesse modifizierte Lipide mit starken anti-entzündlichen Eigenschaften generiert werden. Unsere Studie gewährt einen Einblick in die chemische Identität von OxPL-Produkten welche entzündlichen Prozessen zugrunde liegen und trennt dabei die biologisch aktiven Spezies von den Verbindungen welche keine Aktivität haben, indem sie auf gemeinsame strukturelle Eigenschaften der aktiven Lipide Bezug nimmt. Darüber hinaus identifizierten wir ein vorher unbekanntes Oxidationsprodukt der Arachidonsäure, welches dereinst in der Behandlung von entzündlichen Krankheiten eingesetzt werden könnte.