

Pharmakologie und Toxikologie

Immunologische Untersuchungen am Bronchialsystem: Reaktion auf Lipopolysaccharide, intrazelluläre Signalkaskaden sowie Einflüsse von Ingwer-Inhaltsstoffen und Asymmetrischem Dimethylarginin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
im Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Julia Anna Podlogar
aus Lingen (Ems)
2010

Dekan: Prof. Dr. A. Hensel

Erster Gutachter: Prof. Dr. E. J. Verspohl

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. A. Hensel

Tag der Disputation: 01. Dezember 2010

Tag der Promotion: 01. Dezember 2010

Für Mama, die ich so gern bei allem dabeigehabt hätte.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	<i>Das angeborene Immunsystem</i>	1
1.1.1	Funktion der Oberflächenepithelien	2
1.1.2	Mustererkennung und Phagozytose	3
1.1.3	Das Komplementsystem	5
1.1.4	Weitere lösliche Faktoren des angeborenen Immunsystems.....	5
1.2	<i>Zytokine und Chemokine</i>	6
1.2.1	Interleukin-8	7
1.2.2	RANTES	9
1.3	<i>Lipopolysaccharide und Sepsis</i>	10
1.4	<i>Der Mustererkennungsrezeptor CD14</i>	12
1.4.1	CD-Antigene.....	12
1.4.2	Vorkommen und Struktur von CD14	12
1.4.3	Funktion von CD14	13
1.4.4	Vorkommen auf nicht-myeloiden Zellen.....	14
1.4.5	Klinische Bedeutung von Mutationen am CD14-Gen.....	16
1.5	<i>Toll-ähnliche Rezeptoren</i>	16
1.6	<i>Intrazelluläre Signalkaskaden</i>	18
1.6.1	MAP-Kinasen	18
1.6.1.1	Allgemeines	18
1.6.1.2	Der ERK1/2-Weg.....	19
1.6.1.3	Der JNK-Weg.....	20
1.6.1.4	Der p38-Weg.....	21
1.6.1.5	Weitere MAP-Kinasen	21
1.6.2	Tyrosinkinassen	21
1.6.3	Lipidkinasen	23
1.6.4	NFκB.....	24
1.7	<i>Ingwer</i>	25
1.7.1	Allgemeines	25
1.7.2	Inhaltstoffe	26
1.7.3	Pharmazeutische Verwendung.....	27
1.7.4	Studienlage zur antiinflammatorischen Wirkung.....	28
1.8	<i>Stickstoffmonoxid</i>	29
1.8.1	NO-Synthasen	30
1.8.2	Die Bedeutung von NO für den Respirationstrakt.....	32

1.8.3	Asymmetrisches Dimethylarginin	33
1.8.4	Beeinflussung der Zytokinproduktion durch ADMA	35
1.9	<i>Einfluss von ADMA auf die Zilienschlagfrequenz</i>	36
1.10	<i>NO-Beteiligung an der Kontraktion der Trachealmuskulatur</i>	37
1.11	<i>Zielsetzung der Arbeit</i>	38
2	MATERIAL UND METHODEN.....	40
2.1	Zellkultur.....	40
2.2	BEAS-2B-Zellen	41
2.2.1	U937-Zellen	42
2.2.2	Co-Kultivierung.....	43
2.3	Durchflusszytometrie zum Nachweis von CD14	43
2.4	Dot Blot zum Nachweis von CD14	44
2.5	ELISA zur Messung von IL-8, RANTES und sCD14	46
2.6	Proteome Profiler Array auf Zytokine und MAP-Kinasen	48
2.7	NFκB-Bestimmung an BEAS-2B-Zellen	49
2.7.1	Herstellung des Zellkernextraktes.....	50
2.7.2	NFκB-ELISA	51
2.8	[³ H]-Thymidineinbau zur Messung der Zellproliferation	51
2.9	HPLC zum Nachweis von Retinsäure und Vitamin D ₃	52
2.10	Messung der Zilienschlagfrequenz an Tracheaexplantaten.....	53
2.11	Messung der Tracheakontraktion	54
2.12	Statistik und graphische Darstellung	57
3	TIERE	58
4	ERGEBNISSE.....	59
4.1	Nachweis von CD14.....	59
4.1.1	Durchflusszytometrie	59
4.1.2	Dot Blot.....	60
4.1.3	ELISA	60
4.2	Einfluss von LPS auf die Proliferation von BEAS-2B-Zellen	62
4.3	Einfluss von Genistein auf die Proliferation von BEAS-2B-Zellen	64
4.4	Proteome Profiler [®] Array für MAP-Kinasen	65
4.5	Aktivierung von NFκB	67
4.6	Stimulation der Zytokinsekretion durch LPS.....	69
4.6.1	Vergleich verschiedener Lipopolysaccharide.....	71
4.6.2	Funktionalität des CD14-Rezeptors.....	73
4.6.3	Die Beteiligung intrazellulärer Kinasen am untersuchten Signalweg	74
4.6.3.1	MAP-Kinasen	74

4.6.3.2	Tyrosinkinasen	78
4.6.3.3	PI3-Kinase.....	78
4.6.3.4	IRAK	80
4.6.4	Beteiligung des IL-8-Rezeptors	82
4.6.5	Beteiligung des NFκB-Weges.....	83
4.6.6	Einfluss von Ethanol und Ethylpyruvat	84
4.6.7	Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies	84
4.6.8	Einfluss von Ingwer-Inhaltsstoffen	86
4.6.8.1	Extrakte	86
4.6.8.2	Scharfstoffe	87
4.6.8.3	Ätherisches Öl und Bestandteile.....	87
4.6.9	Co-Kultivierungs-Versuche	91
4.6.9.1	Einfluss der Co-Kultur auf die IL-8-Sekretion	91
4.6.9.2	Identifizierung der verantwortlichen Substanzen	92
4.7	<i>Auswirkung von ADMA auf die Zytokinexpression in BEAS-2B-Zellen.....</i>	<i>94</i>
4.7.1	TNFα.....	94
4.7.2	Interleukin-8 und RANTES	95
4.7.3	Zytokin-Screening.....	96
4.8	<i>Veränderung der Zilienschlagfrequenz durch ADMA</i>	<i>97</i>
4.9	<i>Versuche zum NO-Einfluss auf die Tracheakontraktion</i>	<i>98</i>
5	DISKUSSION	101
5.1	<i>Der CD14-Rezeptor auf BEAS-2B-Zellen.....</i>	<i>101</i>
5.1.1	Nachweis der Existenz von CD14.....	101
5.1.2	Untersuchung der Funktionalität des CD14-Rezeptors.....	103
5.2	<i>Reaktion der BEAS-2B-Zellen auf LPS</i>	<i>104</i>
5.2.1	Veränderung der Proliferation	104
5.2.2	Aktivierung von MAP-Kinasen	106
5.2.3	Aktivierung von NFκB	107
5.2.4	Sekretion von RANTES und TNFα	108
5.2.5	Sekretion von IL-8.....	108
5.2.5.1	Vergleich verschiedener Lipopolysaccharide	109
5.2.5.2	Beteiligte Signalwege	110
5.2.5.3	Co-Kultivierung von BEAS-2B- und U937-Zellen	115
5.2.6	Einfluss von Ingwer-Inhaltsstoffen auf die IL-8-Sekretion	116
5.3	<i>Untersuchungen zur Rolle von NO bzw. ADMA in den Atemwegen.....</i>	<i>118</i>
5.3.1	Beeinflussung der Zytokinproduktion	118
5.3.2	Auswirkungen auf die CBF	120

5.3.3	Einfluss auf die Tracheakontraktion.....	122
6	ZUSAMMENFASSUNG	125
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	129
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	131

Abkürzungsverzeichnis

ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin (N^G, N^G -Dimethyl-L-Arginin)
APC	Allophycocyanin
ARDS	<i>acute respiratory stress syndrome</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CBF	<i>ciliary beat frequency</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CGRP	<i>calcitonine gene related peptide</i>
cN	Centinewton
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
COX	Cyclooxygenase
CSBP	<i>cytokine suppressive antiinflammatory drug-binding protein</i>
DAMP	<i>damage associated molecular pattern</i>
DDAH	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECCM	<i>epithelial cell conditioned medium</i>
E. coli	Escherichia coli
EDRF	<i>endothelium-derived relaxing factor</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular regulated kinase</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FMN	Flavin-Mononukleotid
g	Erdbeschleunigung
G-CSF	<i>granulocyte colony stimulating factor</i>
GMP/GDP/GTP	Guanosinmono-/di-/triphosphat
Gro α	<i>growth regulated oncogene α</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
HUVECs	human umbilical vein endothelial cells
IFN γ	Interferon γ
IgG	Immunglobulin G
I κ B	<i>inhibitors of κB</i>

IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
IP 10	<i>interferone inducible protein 10</i>
IRAK	<i>Interleukin-1-receptor associated kinase</i>
I-TAC	<i>interferone inducible T-cell alpha chemoattractant</i>
JNK	<i>c-jun N-terminal kinase</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
L-NAME	<i>N^G-Nitro-L-Argininmethylester</i>
L-NMMA	<i>N^G-Monomethyl-L-Arginin</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAP2K (= MEK)	MAPK-Kinase
MAP3K (= MEKK)	MAPK-Kinase-Kinase
MBL	Mannan-bindendes Lektin
mCD14	membranständiges CD14
MCP 1	<i>monocyte chemotactic protein 1</i>
MIF	<i>migration inhibiting factor</i>
MIP 1 α	<i>macrophage inflammatory protein 1α</i>
NADPH	Nicotinamidadeninucleotid-diphosphat
NANC	<i>non-cholinergic non-adrenergic</i>
NF κ B	<i>nuclear factor κ B</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOS (iNOS/eNOS/nNOS)	(induzierbare/endotheliale/neuronale) NO-Synthase
PAF	platelet activating factor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI	<i>plasminogen activator inhibitor</i>
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	phosphate-buffered saline
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PIB	<i>phosphatase inhibitor buffer</i>
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₂ /PIP ₃	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat/-3,4,5-trisphosphat
PRMT	Protein-Arginin-N-Methyltransferasen
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i>
Ras-GEF	<i>Ras guanine nucleotid exchange factor</i>
RNS	<i>reactive nitrogen species</i>

ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SAPK	<i>stress-activated protein kinase</i>
sCD14	lösliches CD14 (<i>soluble</i>)
sICAM 1	<i>soluble intracellular adhesion molecule 1</i>
SIN-1	Linsidomin
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SOD	Superoxid-Dismutase
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor α

1 Einleitung

Hinführend auf das Thema der vorliegenden Dissertation soll zunächst ein kurzer Umriss des angeborenen Immunsystems erfolgen, da die untersuchten Vorgänge Bestandteil desselben sind. Es folgen Beschreibungen des Mustererkennungsrezeptors CD14 und der Toll-like-Rezeptoren. Da die Aktivierung der hier verwendeten Bronchialepithelzellen v. a. an der Ausschüttung von Chemokinen wie Interleukin-8 festgemacht wird, schließt sich ein Abschnitt hierüber an. Des Weiteren werden die untersuchten Signalwege skizziert, v. a. die der MAP-Kinasen und anderer intrazellulärer Kinasen, sowie der Transkriptionsfaktor NFκB.

Darüberhinaus werden kurz die wichtigsten Fakten zu der seit langem bekannten Arzneipflanze *Zingiber officinale* umrissen, insbesondere hinsichtlich der für diese Arbeit relevanten antiinflammatorischen Wirkung.

Ein zweiter Schwerpunkt der Arbeit liegt auf der Bedeutung von Stickstoffmonoxid für den Respirationstrakt, daher erfolgt abschließend ein Überblick über die bisherigen Erkenntnisse zu dieser Fragestellung.

1.1 Das angeborene Immunsystem

Das Immunsystem wird in zwei Arme unterteilt: Der phylogenetisch sehr alte angeborene Teil, der rudimentär bereits bei einfachsten Organismen vorhanden ist, reagiert relativ unspezifisch auf eingedrungene Fremdmoleküle oder -organismen und verändert sich im Laufe des Lebens nicht. Im Gegensatz dazu zeichnet sich das entwicklungs geschichtlich wesentlich später aufgetretene adaptive Immunsystem durch eine hohe Spezifität aus und verfügt außerdem über ein „immunologisches Gedächtnis“, das beim Zweitkontakt mit einem bestimmten Antigen eine schnellere und stärkere Reaktion als beim erstmaligen Kontakt ermöglicht.

Im Rahmen dieser Arbeit soll unter anderem untersucht werden, inwieweit das Bronchialepithel durch seine Reaktion auf bakterielle Endotoxine wie Lipopolysaccharide zur angeborenen Immunität beiträgt. Die in späteren Kapiteln beschriebenen Mustererkennungsabläufe unter Beteiligung von CD14 und den TLR sind Signalwege des angeborenen Immunsystems. Daher wird hier nur auf den von Geburt an vorhandenen unspezifischen Teil des Immunsystems näher eingegangen (vgl. hierzu Lehrbücher der Immunologie (1, 2)).

Der Mensch kommt täglich mit zahlreichen verschiedenen Mikroorganismen und anderen Pathogenen in Kontakt. Nur ein Bruchteil dieser Begegnungen führt jedoch tatsächlich zum Ausbruch von Krankheiten. Das angeborene Immunsystem ist in der

Lage, einen Großteil der Eindringlinge innerhalb kürzester Zeit zu identifizieren und zu zerstören. Dabei ist es wichtig, durch eine schnelle Reaktion die weitere Ausbreitung des Erregers zu verhindern; dafür genügt zunächst die Unterscheidung zwischen „körpereigen“ und „fremd“ ohne eine spezifische Differenzierung zwischen verschiedenen Erregern (3). Anders als bei der adaptiven Immunität ist hier keine lange Inkubationszeit und Klonierung antigenspezifischer Lymphozyten erforderlich. Nur wenn ein Pathogen diese frühe Abwehrreaktion überwindet, tritt das adaptive Immunsystem in Aktion.

Die Erkennung von Fremdorganismen erfolgt bei der angeborenen Immunität über keimbahncodierte Rezeptoren, die auf häufig vorkommende Merkmale von Pathogenen reagieren können. Evolutionsgeschichtlich hatten diejenigen Individuen einen Selektionsvorteil, die zufällig durch Mutation und Rekombination über derartige Rezeptoren verfügten, sodass die entsprechenden Gene an die nachfolgenden Generationen weitergegeben wurden. Diese sogenannten Mustererkennungsrezeptoren sind bei den verschiedenen Arten stark konserviert.

Wie auch bei der erworbenen Immunität unterscheidet man im angeborenen Immunsystem zwischen zellulärer Abwehr durch z. B. phagozytierende Zellen und humoraler Abwehr, die durch lösliche Moleküle zustande kommt.

1.1.1 Funktion der Oberflächenepithelien

Der erste Kontakt mit Krankheitserregern erfolgt üblicherweise über äußere und innere Epithelflächen, d. h. über Häute und Schleimhäute. So dringen beispielsweise Influenzaviren über eingeatmete Tröpfchen in die Atemwege ein, Salmonellen gelangen durch kontaminiertes Wasser oder Nahrungsmittel in den Verdauungstrakt, und die Erreger von Geschlechtskrankheiten werden über die Schleimhäute der Genitalien übertragen. Durch die äußeren Epithelien können sich über Wunden oder Abschürfungen z. B. Tetanus-Erreger ausbreiten; Verletzungen durch Insektenstiche bieten Plasmodien oder Gelbfieber-Viren die Möglichkeit zum Eintritt in den Körper.

Die Epithelien stellen zunächst eine mechanische Barriere für eindringende Pathogene dar. Die einzelnen Epithelzellen werden durch sogenannte *tight junctions* zusammengehalten; diese verhindern den Durchtritt von Erregern durch die Zellzwischenräume. Die inneren Epithelien, die z. B. den Respirationstrakt und das gastrointestinale System auskleiden, setzen zudem einen viskösen Schleim frei, der verhindert, dass sich Mikroorganismen an das Epithel anheften. Außerdem werden in die Atemwege eingedrungene Fremdkörper über diesen Schleim in Verbindung mit dem Schlagen der Zilien auf den Epithelzellen wieder nach außen befördert, wo sie

durch Husten entfernt werden können. Die zentrale Bedeutung dieser Vorgänge erkennt man bei Patienten, die an einer Störung der Schleimbildung oder der Zilienbewegung leiden, z. B. an Cystischer Fibrose: Sie erkranken besonders häufig an Infektionen der Atemwege, da dieser erste Schritt der Immunabwehr nicht richtig funktioniert.

Neben der mechanischen Erregerabwehr sondert das Epithel auch chemische Substanzen ab, die Pathogene schädigen können. In Tränenflüssigkeit und Speichel ist das antibakterielle Enzym Lysozym enthalten. Dieses spaltet Peptidoglykane in der Zellwand von Bakterien und Pilzen und tötet sie dadurch ab. Im Gastrointestinaltrakt bilden Magensäure und Verdauungsenzyme eine chemische Barriere gegen Mikroorganismen. Außerdem befinden sich in den Dünndarmkrypten unterhalb der Epithelschicht die sogenannten Paneth-Zellen, die konstitutiv antibakterielle Peptide, die Defensine, sezernieren. Diese tragen dazu bei, die Balance zwischen der Abwehr von Fremdorganismen und der Toleranz gegenüber der normalen Darmflora zu erhalten. Ein Mangel an diesen Defensinen wird mit der Entstehung von entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn in Verbindung gebracht (4). Keratinozyten in der Haut produzieren das antibakterielle Peptid Psoriasin, das die Haut vor Infektionen mit *E. coli*-Bakterien schützt, sodass diese nicht über die äußeren Epithelien in den Organismus eindringen können (5).

In der Flüssigkeit, die die Oberflächenepithelien der Lunge benetzt, finden sich weitere antimikrobielle Proteine, die sogenannten *surfactants*. Diese umschließen eingedrungene Krankheitserreger, die hierdurch leichter von Makrophagen erkannt und aufgenommen werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als Opsonisierung.

Verschiedene Epithelien sind außerdem in der Lage, pro- oder antiinflammatorische Zytokine zu bilden. Die für diese Arbeit verwendete Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B reagiert z. B. auf die Stimulation durch TNF α und IFN γ mit der Ausschüttung zahlreicher Zytokine und Chemokine (siehe Kapitel 4). Auf die Funktionen und Eigenschaften von Zytokinen und ihren Beitrag zum Entzündungsgeschehen wird in Kapitel 1.2 näher eingegangen.

1.1.2 Mustererkennung und Phagozytose

Falls es den Pathogenen gelingt, die Barrierefunktion des Epithels zu überwinden, werden sie im Normalfall durch Makrophagen erkannt. Diese einkernigen Zellen reifen aus im Blut zirkulierenden Monozyten heran und wandern anschließend ins Gewebe ein, wo sie ortsansässig verbleiben. Je nach ihrem Residenzort erfüllen sie unterschiedliche Aufgaben. Ihre Hauptfunktion besteht in der Beseitigung

abgestorbener oder beschädigter Zellen. So eliminieren Milzmakrophagen und die Kupffer'schen Sternzellen der Leber gealterte Erythrozyten; Osteoklasten sorgen in Zusammenarbeit mit den Osteoblasten für eine Homöostase im Knochenauf- und -abbau. Des Weiteren sind Makrophagen in der Lage, Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze und Parasiten durch Phagozytose zu beseitigen. Zu den phagozytierenden Zellen gehören außerdem die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMNs), die normalerweise im Gewebe nicht vorkommen, bei Bedarf jedoch schnell aus dem Blut rekrutiert werden können.

Mit Hilfe bestimmter Rezeptoren an ihren Oberflächen können Phagozyten zwischen der Oberflächenstruktur von körpereigenen und körperfremden Zellen unterscheiden; man bezeichnet diesen Vorgang als Mustererkennung. Voraussetzung hierfür ist das Erkennen von bestimmten Strukturen, die bei zahlreichen verschiedenen Pathogenen vorkommen. Diese werden auch PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) genannt, im Gegensatz zu den DAMPs (*damage associated molecular patterns*), die das Erkennen beschädigter körpereigener Zellen ermöglichen. Zu den Rezeptoren für PAMPs gehört neben dem CD14-Rezeptor und den TLR (*toll-like receptors*), mit denen sich diese Arbeit eingehender beschäftigt, auch die Klasse der Scavenger-Rezeptoren. Diese werden von Makrophagen, Dendritischen Zellen und bestimmten Endothelzellen gebildet und können zahlreiche polyanionische Liganden erkennen; sie sind an der Identifizierung und Internalisierung grampositiver und -negativer Bakterien sowie apoptotischer Zellen beteiligt (6).

Die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems werden in allen Zellen eines Typs gleichermaßen exprimiert; es liegt keine klonale Verteilung wie bei der adaptiven Immunität vor. Die Spezifität wird über das Genom vererbt. Die Aktivierung erfolgt sehr schnell und erfasst ein breites Spektrum an Pathogenen.

Häufig finden sich diese Rezeptoren auf Phagozyten und stimulieren die Aufnahme der erkannten Pathogene. Es kommt auch eine chemotaktische Aktivität vor: Der f-Met-Leu-Phe-Rezeptor erkennt von Bakterien produzierte N-formylierte Peptide und lockt Neutrophile an den Ort der Infektion. Des Weiteren können durch Mustererkennung und nachfolgende Signalwege bestimmte Effektormoleküle produziert werden; dies ist z. B. bei den Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR) der Fall.

Neben den membranständigen gibt es auch lösliche Mustererkennungsrezeptoren. Das Mannan-bindende Lektin (MBL) erkennt pathogene Mikroorganismen an einer bestimmten räumlichen Orientierung und einem bestimmten Abstand der Zuckerreste, die bei humanen Zellen nicht vorkommen. Nach erfolgter Bindung des MBL an das Pathogen wird der Komplex von Phagozyten erkannt und internalisiert. Das MBL leitet außerdem den MB-Lektin-Weg der Komplementaktivierung ein.

Nachdem die Pathogene erkannt worden sind, werden sie internalisiert und intrazellulär in ein sogenanntes Phagosom eingeschlossen, woraufhin die Phagozyten reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies bilden, die die Keime abtöten. Das Phagosom verschmilzt mit den Lysosomen der Zelle zum Phagolysosom, in dem die Mikroorganismen durch Ansäuern verdaut werden. Die sogenannten Antigenpräsentierenden Zellen, z. B. Dendritische Zellen, sind in der Lage, beim Verdau entstehende Peptide auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Dadurch wird den T-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems signalisiert, dass Fremdzellen in den Organismus eingedrungen sind.

1.1.3 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem besteht aus einer Reihe von Blutplasmaproteinen, die sich gegenseitig kaskadenartig aktivieren und letztlich dazu dienen, fremde Zellen (v. a. Bakterien und Pilze) schnell und effizient zu markieren, damit sie von Phagozyten besser erkannt und beseitigt werden können. Die Komplementfaktoren sind jedoch auch selbst dazu in der Lage, fremde Zellen durch Porenbildung und Desintegration der Zellmembran abzutöten. Außerdem werden Entzündungsvorgänge gestartet, z. B. durch die chemotaktische Anlockung und Aktivierung von Leukozyten. Es gibt drei verschiedene Wege der Komplementaktivierung – der MB-Lektin-Weg, der Klassische und der Alternative Weg –, die letztlich alle in eine gemeinsame Endstrecke münden. Hierbei wird der Komplementfaktor C3b kovalent auf der Mikrobenoberfläche fixiert. Phagozyten besitzen Rezeptoren für C3b und erkennen die so opsonisierten Pathogene, die anschließend phagozytiert werden können.

1.1.4 Weitere lösliche Faktoren des angeborenen Immunsystems

Makrophagen, Neutrophile und in geringerem Umfang auch Epithelzellen können nach Kontakt mit Pathogenen hocheffektive kurzlebige Moleküle bilden, die schnell Bakterien und Pilze bekämpfen, aber auch die sie produzierende Zelle selbst schädigen können. Hierzu gehören z. B. reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffmonoxid. Bei der Phagozytose gibt die Zelle Superoxid-Anionen in das entstehende Phagolysosom ab, in welches das Pathogen internalisiert wird. Daraus entstehen Wasserstoffperoxid sowie Hydroxylradikale. Die ROS schädigen durch Peroxidation Membranlipide, DNA und Proteine. Die Immunzelle selbst schützt sich durch Katalase, Superoxid-Dismutase und Glutathion-Peroxidase vor der schädlichen Wirkung der

Sauerstoffradikale; dennoch wird sie meist nach der Aktivierung vernichtet, damit durch ROS verursachte Schäden (v. a. Mutationen der DNA) sich nicht anhäufen.

Stickstoffmonoxid, auf das in einem gesonderten Kapitel näher eingegangen wird, kann Lipide, Proteine und Nukleinsäuren nitrosylieren, wodurch deren Funktionsfähigkeit verloren gehen kann.

Im Rahmen einer Entzündungsreaktion werden außerdem sogenannte Akut-Phase-Proteine ausgeschüttet, deren Produktion in der Leber z. B. durch Interleukin-6 ausgelöst wird. Diese Proteine wirken z. T. proinflammatorisch, aber auch inhibierend bzw. modulierend, um Entzündungsreaktionen lokal zu begrenzen und systemische Inflammationen zu verhindern. Das C-reaktive Protein, das auch als löslicher Mustererkennungsrezeptor fungiert, ist ein wichtiger klinischer Entzündungsmarker, der vor allem bei bakteriellen Infektionen erhöht ist. Auch das oben erwähnte Mannan-bindende Lektin der Komplement-Aktivierung gehört zu den Akut-Phase-Proteinen. Andere Proteine reduzieren z. B. die Verfügbarkeit von Eisen- und Kupfer-Ionen im Blut, die Bakterien für die Zellteilung benötigen.

Die beschriebenen Vorgänge dienen hauptsächlich der Abwehr von Bakterien und Pilzen; für die Bekämpfung von Viren hat sich ein eigenes System entwickelt, in dem Interferone eine bedeutende Rolle spielen.

1.2 Zytokine und Chemokine

Als Reaktion auf eingedrungene Mikroorganismen wird vom angeborenen Immunsystem eine akute Entzündung ausgelöst. Diese hat das Ziel, die Infektion lokal zu begrenzen und eine systemische Ausbreitung zumindest so lange aufzuhalten, bis das spezifischere adaptive Immunsystem seine volle Wirkung entfalten kann. Eine wichtige Rolle bei der Regulation von Entzündungsreaktionen spielen die sogenannten Zytokine. Hierbei handelt es sich um Proteine, die das Verhalten anderer Zellen beeinflussen und nach ihrer Bindung an Zytokinrezeptoren auf der Zelloberfläche z. B. Wachstum, Differenzierung oder den Tod der Zelle verursachen können.

Zu den Zytokinen gehören beispielsweise die Interleukine; der Name rührt daher, dass sie zwischen (lat. *inter*) Leukozyten Signale vermitteln. Auch Interferone, Tumornekrosefaktoren und verschiedene Wachstumsfaktoren werden zu den Zytokinen gezählt.

Zytokine mit chemotaktischer Aktivität werden als Chemokine bezeichnet. Deren Konzentration ist am eigentlichen Entzündungsort am höchsten, da sie von dort befindlichen Zellen gebildet werden, und nimmt mit zunehmender Entfernung ab. So

bildet sich ein Konzentrationsgradient aus, der u. a. Neutrophile Granulozyten zum Ort des Geschehens lockt, da diese über spezifische Chemokinrezeptoren verfügen.

Die Chemokine werden in vier Untergruppen unterteilt, abhängig von der Position der ersten beiden Cysteinbausteine im Molekül. Bei den CXC- und CX₃C-Chemokinen werden diese durch eine bzw. drei Aminosäuren getrennt, wohingegen in der CC-Unterfamilie zwei Cysteinreste nebeneinander auftreten. Die C-Unterfamilie weist nur zwei Cysteinreste auf, deren Positionen denen des zweiten und vierten Cysteins in den anderen Gruppen entsprechen.

1.2.1 Interleukin-8

Interleukin-8 (IL-8) wurde erstmals 1988 von Matsushima *et al.* in den Überständen humaner Monozyten entdeckt, nachdem diese mit Lipopolysacchariden stimuliert worden waren (7). Es gehört zur Familie der Chemokine, d. h. der Zytokine mit chemotaktischer Aktivität gegenüber z. B. Neutrophilen. Interleukin-8 gehört zur CXC-Familie und wird daher auch als CXCL 8 bezeichnet; das „L“ im Namen steht hier für Ligand, entsprechend der Bezeichnung „CXCR“ für den korrespondierenden Rezeptor (8).

Die humane cDNA für IL-8 codiert für ein aus 99 Aminosäuren bestehendes Vorläuferprotein; durch Abspaltungen entstehen die reifen Proteine mit 72 oder 77, seltener auch 69 Aminosäuren, abhängig von der Art der sekretierenden Zelle (7). Hierbei produzieren Fibroblasten und Endothelzellen eher die längerkettige, Leukozyten dagegen eher die kürzere Variante (72 oder 69 Aminosäuren) (8). In hohen Konzentrationen ist IL-8 in der Lage, Homodimere zu bilden. In physiologischen, d. h. nanomolaren Konzentrationen überwiegt jedoch das Monomer, welches die funktionelle Form darstellt (9).

IL-8 bindet mit ähnlicher Affinität an zwei Rezeptoren, CXCR 1 und 2. Hierbei handelt es sich um membranständige, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembranregionen (10). Während der auf die Ligandenbindung folgenden Signalkaskade werden u. a. Ras, Raf und Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) in Neutrophilen aktiviert. Des Weiteren erhöht sich durch die Entstehung von Inositoltrisphosphat und Diacylglycerol der intrazelluläre Calciumspiegel sowie die Expression der Proteinkinase C. Diese und weitere Prozesse führen letztlich zur Aktivierung der Neutrophilen, die u. a. Degranulation, Adhärenz und Chemotaxis zur Folge hat. Beispielsweise können Endothelzellen IL-8 aufnehmen und dieses den Neutrophilen präsentieren. Carveth *et al.* zeigten 1989, dass ein als „neutrophil activating factor“ bezeichnetes Molekül durch Interaktion mit dem CD11b/CD18-

Rezeptor die Adhäsion polymorphkerniger Leukozyten an das Endothel und an subendotheliale Proteine fördert (11). Dieser Faktor wurde von anderen Autoren als Interleukin-8 bezeichnet (12).

Auch gegenüber Basophilen, B- und T-Lymphozyten zeigt IL-8 chemotaktische Aktivität. In Neutrophilen wird des Weiteren die Bildung des *platelet-activating factor* (PAF) sowie der 5-Lipoxygenase induziert, was zur Freisetzung von Leukotrien B₄ führt (13, 14). Verschiedene Zelltypen, wie z. B. Neutrophile, natürliche Killerzellen, Monozyten, T-Zellen, aber auch nichtleukozytäre Zellen wie Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen können dazu angeregt werden, IL-8 zu produzieren. Die Induktion kann unter anderem durch proinflammatorische Zytokine, Bakterien, bakterielle Produkte (z. B. Lipopolysaccharide) oder Viren, aber auch durch Umwelteinflüsse wie Hypoxie erfolgen (8).

Der Zusammenhang zwischen einer Exposition mit Lipopolysacchariden und der IL-8-Produktion wurde u. a. von Broaddus *et al.* untersucht. Eine intrapleurale Applikation von LPS induziert beim Kaninchen eine starke Immigration von Neutrophilen; dies kann durch vorherige Gabe eines anti-IL-8-Antikörpers abgeschwächt werden (15). Eine intravenöse Applikation von LPS bei gesunden Freiwilligen führt zu einem schnellen Anstieg von IL-8 im Plasma (16); an Primaten mit durch LPS oder *E. coli* verursachter Sepsis wurden ebenfalls erhöhte IL-8-Spiegel im Plasma gemessen (17).

Neben bakteriellen können auch virale Infektionen eine erhöhte Produktion von Interleukin-8 verursachen (8).

Im Respirationstrakt stehen erhöhte IL-8-Werte u. a. im Zusammenhang mit ARDS (*acute respiratory distress syndrome*, „Schocklunge“) (18), Reperfusionsschäden nach vorübergehenden Ischämien (19) und durch Rauchinhalation verursachten Verletzungen am Alveolarepithel (20). Bei Patienten mit chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) scheint Interleukin-8 neben TNF α eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Entzündungen zu spielen (21).

Shannon *et al.* fanden bei Patienten mit schwerem Asthma eine erhöhte Interleukin-8-Expression im Bronchialepithel, verglichen mit moderaten Asthmatikern (22). Diese Beobachtung korrelierte mit erhöhten Neutrophilenzahlen im Sputum der schwerer erkrankten Patienten, was sich durch die chemotaktische Wirkung erklären lässt, die Interleukin-8 auf Neutrophile hat. Des Weiteren kommt es während akuter Asthmaanfälle zu einem vorübergehenden Anstieg der IL-8-Konzentration im Sputum (23). Die proinflammatorische Wirkung von IL-8 durch die chemotaktische Aktivität gegenüber Neutrophilen sowie eine am Meerschweinchen nachgewiesene Bronchokonstriktion nach IL-8-Inhalation (24) lassen den Schluss zu, dass Interleukin-8 in direktem Zusammenhang mit der Entstehung von Asthma steht. Außerdem konnte

mit den bei Asthma üblicherweise eingesetzten lang wirksamen β_2 -Agonisten Salmeterol und Formoterol eine Reduktion der IL-8-Produktion an der alveolären Epithelzelllinie A549 erreicht werden, wenn die Zellen mit TNF α stimuliert wurden (25); die β_2 -Agonisten scheinen also neben der bronchodilatatorischen auch eine antiinflammatorische Wirkung zu besitzen. Strandberg *et al.* fanden dagegen an der gleichen Zelllinie, dass die Produktion von IL-6 und IL-8 bei Stimulation mit organischem Staub aus Schweineställen durch die gleichzeitige Anwesenheit von Formoterol und Salmeterol noch weiter gesteigert war (26). Der Effekt der β_2 -Agonisten scheint also von den eingesetzten Stimulantien abzuhängen. Bei den ebenfalls gegen Asthma eingesetzten Glucocorticoiden stellt sich die Situation ähnlich widersprüchlich dar: Während z. B. Liu *et al.* fanden, dass die Gabe von Glucocorticoiden während eines akuten Asthma-Anfalls die Serumkonzentration von Interleukin-8 verringert (27), wiesen Fukakusa *et al.* nach, dass eine zweiwöchige Behandlung mit Methylprednisolon bei Asthmatikern zu einer Heraufregulierung der IL-8-Expression im Bronchialepithel und in der Submucosa führt (28). Allerdings lassen sich diese unterschiedlichen Ergebnisse dadurch erklären, dass einmal eine akute und einmal eine dauerhafte Gabe von Glucocorticoiden untersucht und außerdem das Zytokin in verschiedenen Systemen gemessen wurde.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass Interleukin-8 eine wichtige Rolle bei durch Neutrophile vermittelten Entzündungen spielt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Konzentration dieses proinflammatorischen Zytokins in Zellüberständen gemessen, um die entzündungsfördernden Auswirkungen von Lipopolysacchariden sowie die zugrundeliegenden Signalwege zu testen.

1.2.2 RANTES

RANTES (*regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted*) ist wie das oben beschriebene Interleukin-8 ein chemotaktisches Zytokin, gehört jedoch im Gegensatz dazu zur Familie der CC-Chemokine, was aus der alternativen Bezeichnung CCL5 hervorgeht. Es wirkt chemotaktisch auf Eosinophile, Monozyten und T-Helferzellen, wodurch es zur Aufrechterhaltung und Ausbreitung des Entzündungsgeschehens beiträgt; auf Neutrophile übt es jedoch keine anziehende Wirkung aus (29).

RANTES wird mit der Pathophysiologie verschiedenener entzündlicher Erkrankungen der Atemwege in Verbindung gebracht. Beispielsweise wurde bei Rauchern mit chronischer Bronchitis während akuter Verschlechterungen des Krankheitsbildes eine erhöhte RANTES-Expression im Bronchialepithel und in subepithelialen Zellen

festgestellt, die vermutlich für die gleichzeitig auftretende Eosinophilie bei diesen Patienten verantwortlich ist (30).

Als Rezeptoren für RANTES fungieren CCR 1, CCR 3 und CCR 5, an die jedoch auch andere Liganden wie MIP-1 α (CCL3) binden können. Antagonisten am CCR 1-Rezeptor werden als interessante Targets für die Therapie von Autoimmunerkrankungen angesehen (31).

1.3 Lipopolysaccharide und Sepsis

Lipopolysaccharide sind Bestandteile der Zellwand gramnegativer Bakterien, die als Endotoxine erst bei der Zerstörung der Bakterien oder – seltener – durch die Abgabe von Membranvesikeln freigesetzt werden. Im Gegensatz dazu werden Exotoxine von noch lebenden Bakterien sezerniert. LPS ist für den Menschen eine stark proinflammatorische Substanz und ein hochaktives exogenes Pyrogen.

Lipopolysaccharide werden durch Dampfsterilisation nicht zerstört; Parenteralia müssen nicht nur steril, d. h. frei von lebenden, vermehrungsfähigen Keimen sein, sondern auch pyrogenfrei, was z. B. durch Sterilfiltration erreicht werden kann.

Die Lipidkomponente eines Lipopolysaccharids wird als Lipid A bezeichnet; sie stellt das toxische Prinzip dar. Dieses glucosaminhaltige Phospholipid ist Bestandteil der äußeren Membran – einer Lipid-Doppelschicht – gramnegativer Bakterien. Die Polysaccharidketten bestehen aus dem sogenannten „core“-Teil und einer variablen O-spezifischen Kette. Die O-Kette ist auf Grund unterschiedlicher Zuckermoleküle jeweils sehr spezifisch für eine Bakterienart, sodass darüber eine Identifizierung des Bakteriums erfolgen kann.

Über die unten beschriebenen Rezeptoren CD14 und TLR4 stimuliert das exogene Pyrogen LPS verschiedene Zelltypen u. a. zur Produktion von endogenen Pyrogenen wie Zytokinen, Chemokinen und weiteren Mediatoren der angeborenen Immunität, um eingedrungene Fremdorganismen zu bekämpfen. Zunächst findet eine Akut-Phase-Reaktion statt, die sich durch Fieber, Katabolismus und verstärkte Granulozytenproduktion äußert. Endothelzellen bilden verstärkt Adhäsionsmoleküle, wodurch Granulozyten an der Gefäßwand adhären können; so können sie die Gefäßwand durchwandern und zum Infektionsherd im darunterliegenden Gewebe gelangen. Die Freisetzung von Kininen durch LPS hat u. a. Vasodilatation, Permeabilitätsstörungen und Kontraktion der glatten Muskulatur zur Folge. Durch verstärkte Anheftung von Granulozyten und Thrombozyten am Gefäßendothel kommt es zu Störungen der Mikrozirkulation, die in Kombination mit der Vasodilatation zu einem septischen Schock und Multiorganversagen führen können.

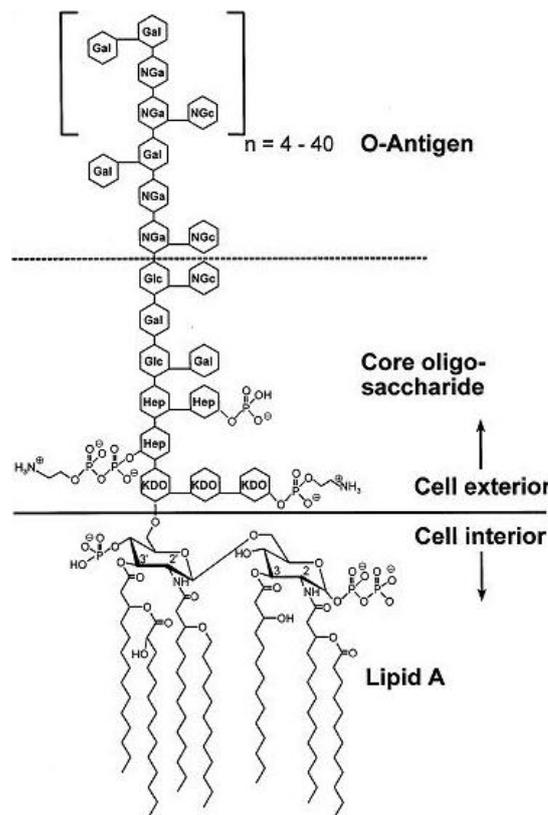


Abbildung 1.1: Struktur eines Lipopolysaccharids (63)

Als Sepsis bezeichnet man gemeinhin systemische Infektionen mit Bakterien oder Pilzen, d. h. das Eindringen dieser Mikroorganismen in die Blutbahn aus einem sogenannten „septischen Herd“ irgendwo im Organismus. Durch Streuung können weitere Herde entstehen, die als „septische Metastasen“ bezeichnet werden. Es kommt zu einer generalisierten Entzündungsreaktion und zur Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren wie Interleukin-1 und -8 oder TNF α . Der Patient leidet u. a. an Fieber oder auch Hypothermie (< 36 °C), Tachykardie und Tachypnoe; im Blutbild zeigt sich eine Veränderung der Leukozytenzahl (32). Ein sicheres Diagnosekriterium ist der Nachweis von Bakterienstämmen im Blut, allerdings ist dies in 30 % der Fälle nicht möglich, obwohl auf Grund der klinischen Symptome eine Infektion wahrscheinlich ist (33). In diesem Fall spricht man von einem *systemic inflammatory response syndrome*, kurz SIRS.

In Deutschland treten pro Jahr ca. 79.000 Fälle von Sepsis und ca. 75.000 Fälle von schwerer Sepsis und septischem Schock auf, wovon ca. 57.000 Patienten versterben. (Zahlen von 2007 (33)). 50-70 % dieser Fälle sind nosokomial entstanden (34). Bis 1990 dominierten gramnegative Bakterien als häufigste Erreger der Sepsis, wurden aber von den grampositiven Bakterien abgelöst. Insgesamt nimmt die Häufigkeit von Sepsis, septischem Schock und SIRS stetig zu.

1.4 Der Mustererkennungsrezeptor CD14

1.4.1 CD-Antigene

Verschiedene Zelltypen durchlaufen während ihrer Differenzierung zu voll ausgereiften Zellen mehrere Stadien, die durch die Expression unterschiedlicher Oberflächenantigene, der CD-Antigene (CD = *cluster of differentiation*), charakterisiert sind. Diese sind z. B. von zentraler Bedeutung für die Kontrolle der Funktion reifer Monozyten bzw. Makrophagen (28, 35). Mittlerweile sind Hunderte dieser Antigene bekannt, die im Immunsystem die verschiedensten Funktionen erfüllen. Einige von ihnen werden zur Charakterisierung von T-Lymphozyten herangezogen. So spricht man von CD4- oder CD8-T-Zellen. CD4 und CD8 sind wichtige Co-Rezeptoren für die Erkennung von Antigenpeptiden, die auf der Oberfläche Antigenpräsentierender Zellen an MHC-Moleküle gebunden sind. CD4 spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der HIV-Infektion: Da ein viruseigener Komplex aus Glykoproteinen hochaffin an dieses Oberflächenantigen bindet, kann das Virus nur solche Zellen befallen, die CD4 exprimieren. Dies sind vor allem T-Lymphozyten sowie in geringerem Umfang Dendritische Zellen und Makrophagen.

1.4.2 Vorkommen und Struktur von CD14

1981 beschrieben Griffin *et al.* erstmals eine Reihe von Antigenen (MY3, 4, 7 und 8) auf der Oberfläche von normalen und malignen myeloiden Zellen. Sie stellten die Vermutung auf, dass einige dieser Antigene Differenzierungsmerkmale von Monozyten und Makrophagen darstellen könnten, da sie auf myeloiden Vorläuferzellen nicht vorkommen und ihre Expression sich in verschiedenen Stadien der Differenzierung verändert (36). Gemeinsam mit anderen Epitopen wurden diese später unter der Bezeichnung CD14 zusammengefasst (37, 38). Das Oberflächenantigen CD14 ist ein leucinreiches Glycoprotein mit einer Größe von 53-55 kDa (39), das über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI) mit der Zellmembran verbunden ist und keine eigene Transmembranregion besitzt (40). Es existiert jedoch auch eine lösliche Form von CD14, die z. B. in Überständen von Monozytenkulturen, in menschlichem Serum in Konzentrationen von 2 bis 6 µg/ml (41) sowie im Urin von Patienten mit Nierenschädigungen gefunden wurde (42). Interessanterweise gibt es Anhaltspunkte dafür, dass CD14 beim Huhn im Gegensatz zu Säugetieren selbst eine transmembranäre Domäne aufweist (43).

Das entsprechende Gen befindet sich zusammen mit denen anderer Rezeptoren und Wachstumsfaktoren, z. B. dem Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF), beim Menschen auf dem Chromosom 5 (44). Aus diesem Grund wurde vermutet, dass CD14 ebenfalls einen Rezeptor darstellt, ohne dass zunächst der entsprechende Ligand bekannt war (45).

1.4.3 Funktion von CD14

Die Funktion von CD14 wurde schließlich von Wright *et al.* entdeckt. Diese Gruppe beschrieb 1990 erstmals einen Zusammenhang zwischen Lipopolysacchariden (LPS) gramnegativer Bakterien, dem Lipopolysaccharid-bindenden Protein (LBP) und CD14. Bei LBP handelt es sich um ein Serumglykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa. Es fungiert als Akut-Phase-Protein, dessen Konzentration während entzündlicher Prozesse ansteigt (46). Im Serum gesunder Menschen beträgt der Gehalt an LBP ca. 10 µg/ml (47).

LPS induziert bei Leukozyten die Sekretion verschiedener Zytokine, z. B. TNF α . Im Blutkreislauf bildet LPS zunächst einen Komplex mit dem LBP; dieser wird anschließend von CD14 gebunden.

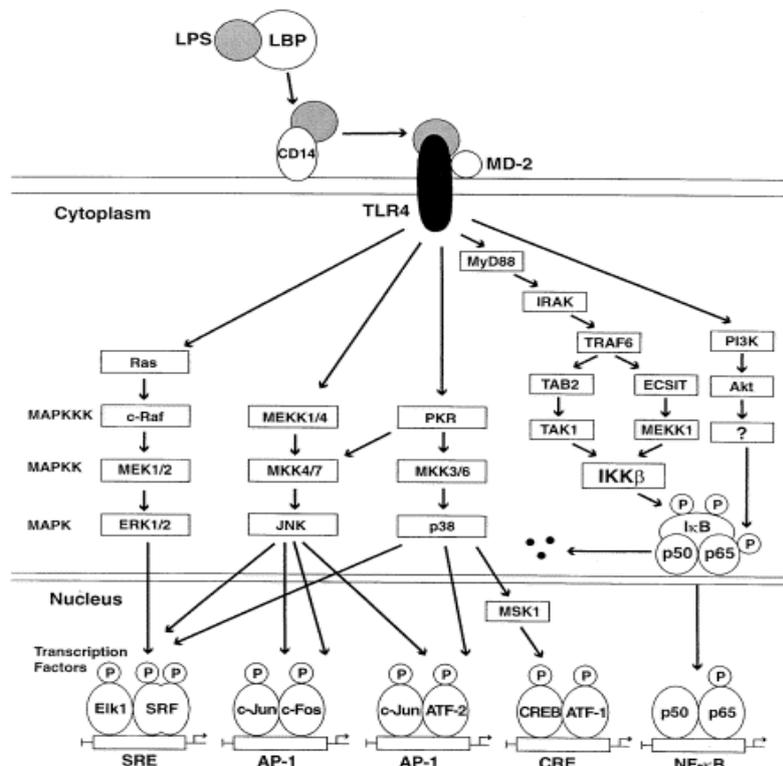


Abbildung 1.2: Intrazelluläre Signalwege nach LPS-Stimulation (63)

Eine Blockade von CD14 mit einem spezifischen Antikörper verhindert die vermehrte Abgabe von TNF α ins Vollblut, das mit LPS inkubiert wurde. Daraus wurde geschlossen, dass CD14 als Rezeptor für LPS fungiert (48). Diese Ergebnisse wurden durch weitergehende Studien bestätigt, z. B. mit CD14-defizienten Zellen, die mit dem entsprechenden Gen transfiziert wurden, oder durch Blockade von CD14 und LBP mit spezifischen Antikörpern (49). Zwar ist die Komplexbildung zwischen LPS und LBP nicht unbedingt nötig für die Reaktion der Zellen, allerdings wird die Aktivierung in Anwesenheit von LBP deutlich erleichtert. In dieser Situation erfolgt eine Aktivierung bereits bei LPS-Konzentrationen von wenigen Nanogramm bis Picogramm pro Milliliter; solche Werte werden auch *in vivo* bei Patienten mit Sepsis gefunden (46, 50). Im Laufe der Zeit mehrten sich die Belege dafür, dass CD14 als Mustererkennungsrezeptor (*pattern recognition receptor*) des angeborenen Immunsystems fungiert. Hierfür spricht die Tatsache, dass die LPS-bindende Region im CD14-Molekül bei verschiedenen Spezies stark konserviert ist und eine hohe Gensequenzhomologie aufweist (37). Im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem entwickelt sich das angeborene nicht erst nach Kontakt mit bestimmten Antigenen, sondern ist nativ vorhanden, um ohne spezifische Antikörper einen Abwehrmechanismus gegen eine Vielzahl von Krankheitserregern zu bilden. CD14 spielt hierbei eine wichtige Rolle, da es den Zellen die Reaktion auf Pathogene wie LPS und andere Bestandteile gramnegativer und -positiver Bakterien erst ermöglicht.

1.4.4 Vorkommen auf nicht-myeloiden Zellen

Zunächst war die vorherrschende Meinung, dass membranständiges CD14 nur von Monozyten, Makrophagen und in geringerem Maße neutrophilen Granulozyten exprimiert wird. Später wurde der Rezeptor auch auf Basophilen, Kupfferzellen, Dendritischen Zellen und Lymphozyten gefunden (38). Die ursprüngliche Theorie besagte, dass das durch einen GPI-Anker mit der Membran verbundene Protein bei Bedarf von der Zelle abgespalten bzw. von dieser sezerniert wird und ins Serum übergeht; somit ermöglicht es als lösliches CD14 auch anderen (CD14-negativen) Zellen die Reaktion auf LPS. Pugin *et al.* beschrieben diesen Vorgang für HUVEC-Zellen (*human umbilical vein endothelial cells*) und menschliche Epithelzellen sowie deren Aktivierung durch Lipopolysaccharide aus *Salmonella minnesota*. In serumfreiem Medium sezernierten die mit LPS stimulierten Zellen weder Interleukin-6 noch -8; erst nach Zusatz von Normalem Humanem Serum (NHS) konnten die beiden Chemokine erfasst werden. In Anwesenheit von Antikörpern sowohl gegen CD14 als auch gegen LBP waren die Effekte des Serumzusatzes wieder aufgehoben. Dies deutet darauf hin,

dass im Serum enthaltenes sCD14 und LBP für die Reaktion der Zellen auf LPS verantwortlich sind (47).

Die Erkenntnis, dass bestimmte nicht-myeloide Zellen auch dann auf LPS reagieren, wenn kein Serum vorliegt, das eventuell lösliches CD14 enthalten könnte, stellte diese Theorie in Frage. Umgekehrt reagieren CD14-negative Zellen wie CHO-Fibroblasten (*Chinese Hamster Ovary*) auch dann nicht auf LPS, wenn Serum mit löslichen CD14 vorhanden ist. Erst durch Transfektion mit dem entsprechenden Gen kann eine Reaktion auf LPS beobachtet werden (51).

Schulz *et al.* zeigten eine LPS-induzierte Produktion der Interleukine-6 und -8 an der alveolären Pneumozytenlinie A549 und der Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B; die Reaktion fiel in Anwesenheit von Serum zwar wesentlich stärker aus, geringe Mengen an Zytokinen waren jedoch auch ohne Serum messbar (52).

Drei verschiedene humane intestinale Epithelzelllinien (HT-29, SW-480 und Caco-2) wurden von Funda *et al.* auf CD14 sowie hinsichtlich ihrer Reaktion auf Lipopolysaccharide untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Anzahl der Rezeptoren auf den verschiedenen Zellen mit dem Differenzierungsgrad der Zelllinie korrelierte. Außerdem sezernierten die Epithelzellen lösliches CD14 in den Zellüberstand. Auf Stimulation mit LPS (*E. coli* Serotyp 055:B5) reagierten HT-29 und SW-480 in serumfreiem Medium mit einem starken Anstieg der Interleukin-8-Produktion (53). Da Darmepithelzellen neben dem Atemwegsepithel sehr früh mit Krankheitserregern in Kontakt kommen, könnte die Anwesenheit und Sekretion von CD14 einen Hinweis auf den Mechanismus von Abwehrreaktionen gegen oral aufgenommene Pathogene liefern.

Auch auf HUVECs konnten unter optimierten Bedingungen bezüglich der Passagezahl und der Auswahl des Antikörpers CD14-Rezeptoren nachgewiesen werden. Bei mehrmaliger Passage nahm die Zahl der Rezeptoren rasch ab, und nur Antikörper gegen bestimmte Epitope des Antigens erzeugten positive Signale. Daher scheint es nicht verwunderlich, dass bei früheren Studien kein CD14 auf HUVECs nachgewiesen werden konnte (37).

Mittlerweile kann man also davon ausgehen, dass CD14 nicht ausschließlich auf myeloiden Zellen vorkommt. Im Rahmen dieser Arbeit soll u. a. die Anwesenheit des Rezeptors auf der humanen Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B sowie deren Reaktion auf LPS in serumfreiem Medium untersucht werden.

1.4.5 Klinische Bedeutung von Mutationen am CD14-Gen

In klinischen Studien wurden Zusammenhänge zwischen CD14 und zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Zuständen beschrieben. So konnten bestimmte SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) auf den Genen für CD14 und TLR4 mit einem erhöhten Risiko, an Asthma zu erkranken, in Verbindung gebracht werden (54). Eine Studie mit Traumapatienten deutet darauf hin, dass SNPs am CD14-Gen bei Han-Chinesen das Auftreten von Multiorganversagen und Sepsis beeinflusst (55). Auch die Anfälligkeit für chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa) scheint mit Polymorphismen am CD14-Gen zusammenzuhängen (56). In einer Studie mit Verbrennungsoptionen wurde weiterhin festgestellt, dass das Risiko, eine schwere Sepsis zu entwickeln, bei Vorhandensein eines bestimmten Allels auf dem CD14-Gen erhöht ist (57). Die Plasmakonzentration von löslichem CD14 wird in Studien als Marker für den Erfolg antiinflammatorischer Behandlung verwendet. So sinkt bei einer Behandlung von Morbus Crohn-Patienten mit Atorvastatin nicht nur der Gehalt an TNF α und dem C-reaktiven Protein, sondern auch an sCD14 (58).

Auch wenn die Zusammenhänge noch nicht genau geklärt sind, scheint CD14 im angeborenen Immunsystem eine wichtige Rolle zu spielen. Die genauere Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen ist von großer Bedeutung für das Verständnis der angeborenen Immunität gegenüber eingedrungenen Pathogenen.

1.5 Toll-ähnliche Rezeptoren

Der Legende nach stieß die Entwicklungsbiologin und Nobelpreisträgerin Christiane Nüsslein-Volhard Mitte der 1980er Jahre den Ausruf „Toll!“ aus, als sie das Gen für ein bis dahin unbekanntes Protein entdeckte, welches bei der Embryonalentwicklung der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* eine wichtige Rolle spielt. Dementsprechend nannte sie das Gen Toll (59). Später zeigte sich, dass das hiervon codierte Rezeptorprotein entscheidend zur Immunabwehr der Fruchtfliege gegen *Aspergillus*-Arten beiträgt (60). Strukturell und funktionell sehr ähnliche Rezeptoren wurden kurz darauf auch in Säugetieren entdeckt und entsprechend Toll-ähnliche Rezeptoren (*toll-like receptors*, TLR) genannt.

Beim Menschen wurden bisher 11 verschiedene TLR beschrieben, die alle einen Beitrag zur Mustererkennung von Mikroorganismen leisten. In der Kombination sind sie in der Lage, nahezu alle relevanten Pathogene zu erkennen und deren immunologische Bekämpfung einzuleiten (61). Die starke evolutionäre Konservierung

dieser Gene von einfachsten Organismen bis hin zu den Säugetieren deutet auf eine entscheidende Funktion bei der Abwehr von Pathogenen hin.

Die TLR sind transmembranäre Glykoproteine und verfügen extrazellulär über mehrere Leucin-reiche Domänen, die für die Erkennung der Fremdstrukturen essentiell sind. Man nennt diese Strukturen Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP).

Ein für diese Arbeit besonders wichtiger Subtyp ist der TLR4; dieser fungiert nämlich als Rezeptor für bakterielle Lipopolysaccharide (62). TLR4 ist der Signalüberträger der LPS-Bindung ins Zellinnere. Der GPI-Anker von CD14, an welches der LPS-LBP-Komplex zunächst bindet, weist keine Transmembranregion auf und kann somit das Signal nicht ins Innere der Zelle übertragen. An humanen Monozyten gibt TLR4 in Verbindung mit einem weiteren assoziierten Protein, dem MD-2, das Signal ins Innere der Zelle weiter. Nach erfolgter Ligandenbindung werden intrazellulär zahlreiche Signalkaskaden in Gang gesetzt, die u. a. in der Aktivierung von NF κ B und der Ausschüttung von Zytokinen münden (63). Auch Zelldifferenzierung, -proliferation und Apoptose können nach TLR-Aktivierung eingeleitet werden.

Ob dieser Signalweg bei allen Zellen, die auf LPS reagieren, ähnlich verläuft, ist noch unklar. Im Rahmen dieser Arbeit soll der Signalweg der LPS-Aktivierung an BEAS-2B Zellen genauer untersucht werden.

Toll-ähnliche Rezeptoren wurden ähnlich wie CD14 zunächst nur auf Immunzellen wie Makrophagen, Natürlichen Killerzellen und Dendritischen Zellen vermutet und nachgewiesen. Kürzlich wurde jedoch beschrieben, dass die in dieser Arbeit verwendeten BEAS-2B-Bronchialepithelzellen mehrere dieser Rezeptoren exprimieren (TLR1-6 und 9) (64). Somit liegt also die Vermutung nahe, dass auch CD14 auf diesen Zellen vorkommt, was aber bisher noch nicht nachgewiesen wurde.

Die Beteiligung von TLR an verschiedensten intrazellulären Vorgängen macht sie zu einem interessanten Target in der Arzneistoffentwicklung. Derzeit befinden sich zahlreiche Agonisten und Antagonisten in der klinischen Entwicklung, die Einsatz bei Allergien, Asthma, Autoimmunerkrankungen, Sepsis, Arteriosklerose und bestimmten Krebsarten finden sollen. V. a. die Anwendung von TLR4- Antagonisten zur Behandlung der Sepsis liegt nahe; hier ist das Eritoran[®], ein Struktur analogon der Lipid-A-Domäne von Lipopolysacchariden, ein aussichtsreicher Kandidat (65).

1.6 Intrazelluläre Signalkaskaden

1.6.1 MAP-Kinasen

1.6.1.1 Allgemeines

Die Phosphorylierung von Proteinen durch Kinasen – Enzyme mit der Fähigkeit, Phosphatgruppen zu übertragen – spielt eine wichtige Rolle bei der zellulären Signaltransduktion. Allen Proteinkinasen gemeinsam ist die Übertragung der γ -Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat (ATP) auf die Hydroxylgruppe eines Serin-, Threonin- oder Tyrosinrestes im Protein.

Von großer Bedeutung sind die sogenannten Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), die an der Regulation zahlreicher intrazellulärer Prozesse beteiligt sind; dazu gehören z. B. Embryogenese, Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Entzündungsvorgänge. MAPK sind Bestandteile von Signalkaskaden, die über mehrere Stufen Signale von den Rezeptoren der Zelloberfläche ins Innere der Zelle weitergeben (66).

Erstmals beschrieben wurden diese Kinasen 1987 von Ray und Sturgill, die bei der Behandlung von 3T3-L1-Adipozyten mit Insulin die Stimulation einer bis dahin unbekanntes Serin-/Threonin-Proteinkinase feststellten (67). Diese phosphorylierte das Mikrotubulus-assoziierte Protein 2 (MAP2) und wurde daher MAP-Kinase genannt; da man später feststellte, dass viele Stimuli der MAPK Mitogene sind, steht die Abkürzung heute für Mitogen-aktivierte Proteinkinase (68).

Mittlerweile wurden zahlreiche verschiedene MAPK entdeckt, die sich im Wesentlichen drei Familien zuordnen lassen: ERK1/2, JNK und p38. Allen Kaskaden gemeinsam ist die Existenz eines dreistufigen Signalwegs, wobei die eigentlichen MAPK zunächst selbst von einem spezifischen Protein aus der Familie der MAPK-Kinasen (MAP2K oder MEK) an Tyrosin- und Threoninresten phosphoryliert und damit aktiviert werden (66); die MAPKK werden ihrerseits vorher durch MAPK-Kinase-Kinasen (MAP3K oder MEKK) phosphoryliert. Hierbei kann jedoch eine MAP2K von mehreren verschiedenen MAP3K aktiviert werden. Die Phosphorylierung muss jeweils an zwei Aminosäuren zugleich erfolgen, um eine vollständige Aktivierung zu erreichen.

Durch diese aufeinander folgenden Vorgänge kommt es zu einer mehrstufigen Signalverstärkung. Außerdem besteht so die Möglichkeit, an verschiedenen Stellen im Prozess einzugreifen und die Signalweitergabe zu hemmen oder ggf. zu verstärken (69). Da die MAPK-Signalwege von verschiedensten Faktoren in Gang gesetzt werden können, trägt die kaskadenartige Form der Signalweitergabe auch dazu bei, dass

einerseits verschiedene Stimuli zur gleichen Antwort und andererseits ein bestimmter Stimulus zu vielfältigen Effekten führen kann.

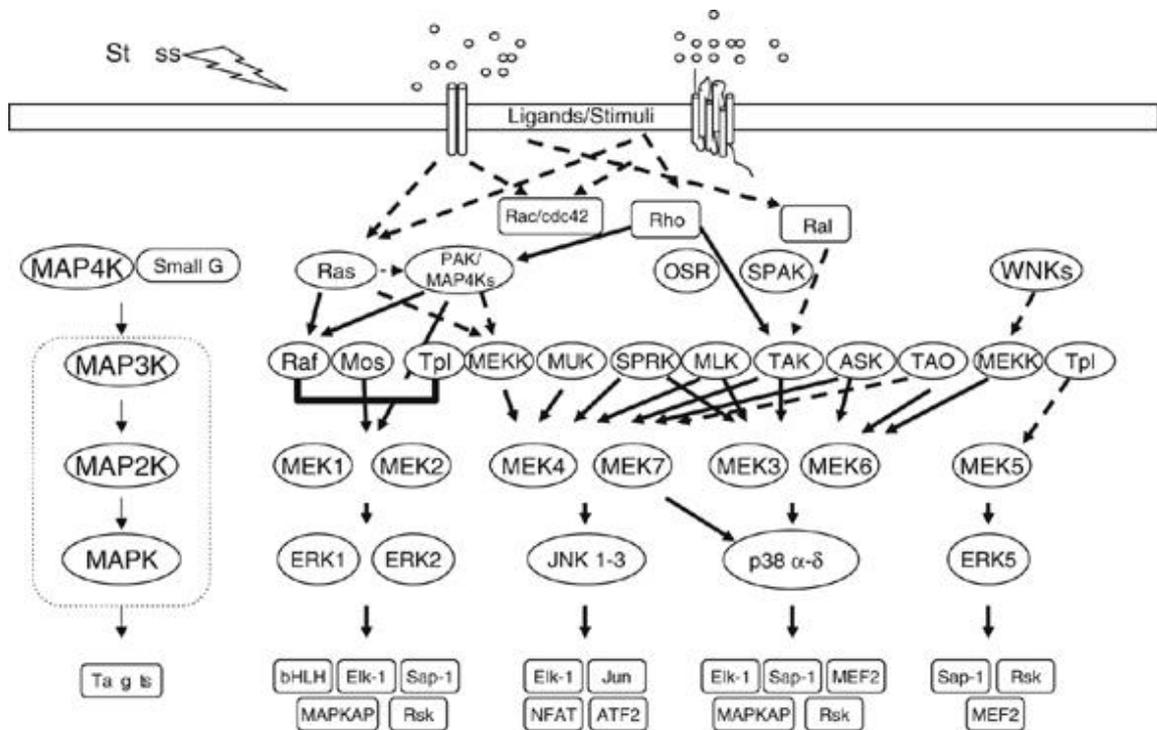


Abbildung 1.3: Modellhafte Darstellung der MAPK-Kaskade (66)

1.6.1.2 Der ERK1/2-Weg

Die von Ray und Sturgill anfangs entdeckten Kinasen gehören zur Familie der ERK1/2-MAPK. ERK steht für *extracellular regulated kinase*; eine etwas irreführende Bezeichnung, denn auch die anderen MAPK werden durch extrazelluläre Stimuli aktiviert. ERK 1 und 2 weisen ein Molekulargewicht von 41 bzw. 43 kDa auf. Sie stimmen zu 83 % in ihrer Aminosäuresequenz überein, wobei die hauptsächlichsten Unterschiede außerhalb des aktiven Zentrums liegen, und werden ubiquitär exprimiert (66). Aktiviert werden sie u. a. von Wachstumsfaktoren, Phorbolestern, Zytokinen und Chemokinen, Liganden für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und zellulärem Stress. In differenzierten Zellen werden die MAPK oft von denjenigen α -Stimuli aktiviert, die auch für die Regulation der Zellfunktion zuständig sind, z. B. Glucose in Inselzellen und Neurotransmitter im Gehirn (70).

Die vorherrschenden MAP3K, die am Anfang der Signalkaskade stehen, sind beim ERK1/2-Weg verschiedene Isoformen von Raf; abhängig von Zelltyp und Stimulus kommen aber auch Mos, Tpl2 und andere MAP3K in Frage. Raf selbst wird durch verschiedene kleine G-Proteine der ras-Familie aktiviert. Auf die MAP3K folgt in der Kaskade entweder die MEK1 oder die MEK2, welche als MAP2K für die Phosphorylierung der ERK1 bzw. ERK2 zuständig sind. Diese erfolgt an einem Tyrosin- und einem Threoninrest, die durch einen Glutamatrest getrennt sind (71).

Durch diese Kaskade aktiviert, können ERK 1 und 2 nun ihrerseits ihre Substrate phosphorylieren; dies geschieht als duale Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten, in deren Nachbarschaft sich ein Prolinrest befindet (70). Hierdurch werden verschiedenste intrazelluläre Vorgänge beeinflusst, z. B. Zellmotilität, Proliferation, Differenzierung und Apoptose.

Ausreichend selektive Hemmstoffe der ERK1/2 selbst sind bisher nicht beschrieben. Eine Unterbrechung der Signalkaskade für experimentelle Zwecke ist jedoch auf der Ebene der MAP2K möglich: Die Substanz PD 98059 hemmt die MEK, indem sie an die inaktive Form des Enzyms bindet und dessen Phosphorylierung durch stromaufwärts liegende Kinasen wie Raf verhindert (72). Wenn also durch Zusatz von PD 98059 eine Abschwächung eines bestimmten biologischen Effekts eintritt, kann man von einer Beteiligung des ERK1/2-Weges ausgehen.

1.6.1.3 Der JNK-Weg

Die Mitglieder der JNK-Familie (*c-jun N-terminal kinases*) werden auch als *stress-activated protein kinases* (SAPK) bezeichnet. Die Aktivierung erfolgt z. B. durch proinflammatorische Zytokine, äußerliche Faktoren wie Hitze, ionisierende Strahlung, UV-Strahlung, oxidativen Stress oder DNA-Schäden, jedoch weniger durch Wachstumsfaktoren. Die JNK sind an der Zytokinproduktion und anderen entzündlichen Vorgängen beteiligt. Sie leisten somit einen wichtigen Beitrag zur angeborenen Immunität (70).

Die Isoformen JNK 1, 2 und 3 (bzw. SAPK β , α und γ) sind ubiquitär exprimiert, wobei jedoch JNK 3 vor allem im Gehirn vorkommt.

Als MAP2K fungieren in diesem Signalweg vor allem die Kinasen MKK 4 und MKK 7; diese phosphorylieren die JNK an einem Threonin- und einem Tyrosinrest, die durch einen Prolinrest getrennt sind. MKK 4 und 7 sind nicht ganz so spezifisch für JNK wie die MEK 1 und 2 im ERK-Weg, da sie *in vitro* auch Kinasen des p38-Weges phosphorylieren können (70).

Die Gruppe der MAP3K ist im JNK-Weg sehr heterogen; sie beinhaltet z. B. die Kinasen MEKK 1-4, MLK (*mixed lineage kinases*), Tlp2, TAK1 und viele andere. Viele dieser Kinasen beeinflussen auch die anderen MAPK-Wege sowie weitere Signalkaskaden, z. B. die Aktivierung von NFκB. Der JNK-Weg kann durch SP 600125, einen selektiven Inhibitor der JNK, gehemmt werden.

1.6.1.4 Der p38-Weg

Von der p38-Familie sind bisher vier Isoformen beschrieben (p38 α-δ). p38α wird auf Grund seiner Eigenschaft, die Zytokinausschüttung in mit LPS stimulierten Monozyten zu hemmen, auch als CSBP (*cytokine suppressive antiinflammatory drug-binding protein*) bezeichnet. Während p38α und β ubiquitär vorhanden sind, findet sich p38γ hauptsächlich im Skelettmuskel und die δ-Form vor allem in der Lunge, der Niere und dem Dünndarm (70).

p38-MAPK reagieren auf zahlreiche extrazelluläre Stressoren wie UV-Strahlung, osmotischen Stress, Hypoxie und proinflammatorische Zytokine (66). Dieser Teilweg der MAPK ist an immunologischen Vorgängen, Zelldifferenzierung und Apoptose beteiligt.

Stromaufwärts kommen als MAP2K die MEK 3 und 6 sowie eine Vielzahl verschiedener MAP3K vor. Für den p38-Weg sind mit SB 203580, SB 202190 u. a. mehrere spezifische Inhibitoren zu pharmakologischen Testzwecken verfügbar (72).

1.6.1.5 Weitere MAP-Kinasen

Neben den oben beschriebenen MAPK-Wegen wurden weitere Isoformen beschrieben, die sich noch keiner Gruppe zuordnen lassen. Dazu gehören die ERK 3, ERK 5 und ERK 7; außerdem NLK und MOK. Deren Funktion und Eigenschaften sind noch nicht vollständig geklärt. Allerdings weisen sie große strukturelle Ähnlichkeiten mit anderen MAPK auf, was eine Zugehörigkeit zu dieser Familie nahelegt.

1.6.2 Tyrosinkinasen

Rezeptor-Tyrosinkinasen sind neben den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren einer der bedeutendsten Typen von Rezeptoren der Zelloberfläche. Anders als die beschriebenen intrazellulären Protein- und Lipidkinasen sorgen sie über ihre Transmembranregion für eine Signalweitergabe von der Oberfläche ins Innere der Zelle.

Für die Aktivierung einer Rezeptor-Tyrosinkinase müssen zunächst durch Bindung eines Liganden zwei Rezeptormoleküle in räumliche Nähe zueinander gebracht und dimerisiert werden. Dadurch kommt es zu Konformationsänderungen im Rezeptor und zunächst zu einer Autophosphorylierung der Kinasedomänen an Tyrosinresten auf cytosolischer Seite; anschließend können die Tyrosinreste verschiedener Zielproteine phosphoryliert und mehrere stromabwärts liegende Signalkaskaden aktiviert werden, z. B. MAP-Kinasen. Durch Phosphorylierung einer Rezeptor-Tyrosinkinase kann das Adapterprotein Grb2 gebunden werden, welches den Ras-GEF (*Ras guanine nucleotide exchange factor*) rekrutiert, der wiederum an Ras den Austausch von GDP gegen GTP beschleunigt. Ras gehört zur Klasse der sogenannten „kleinen G-Proteine“; dies sind monomere GTP-bindende Proteine, die an zahlreichen regulatorischen Zellvorgängen beteiligt sind. Das durch die GTP-Bindung aktivierte Ras katalysiert anschließend die Aktivierung einer MAPK-Kinase-Kinase als ersten Teil der dreistufigen MAPK-Kaskade (73).

Ein wichtiger Vertreter der Tyrosinkinasen ist der Insulinrezeptor; auch der Rezeptor für den Epidermiswachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) und weitere Wachstumsfaktoren gehören zu dieser Gruppe.

Da der EGF-Rezeptor von vielen Tumorzellen exprimiert wird, stellt seine Antagonisierung durch Antikörper wie Cetuximab (Erbitux®) oder Tyrosinkinaseinhibitoren, die auch als Tyrosinkinaseinhibitoren (*tyrosine phosphorylation inhibitors*) bezeichnet werden, ein wichtiges Target in der Tumorthherapie dar. Das Problem ist jedoch, dass Proteinkinasen an nahezu allen zellphysiologischen Vorgängen beteiligt sind und zudem die ATP-Bindungsstelle, an der auch die meisten Inhibitoren angreifen, hoch konserviert ist – eine Hemmung kann also zahlreiche unspezifische Folgen für die Zellphysiologie haben. Dennoch sind im Gegensatz zu selektiven Serin-/Threoninkinaseinhibitoren seit einigen Jahren mehrere Tyrosinkinaseinhibitoren im Markt. Ein Beispiel ist das Lapatinib (Tykerb®), ein dualer EGFR/HER2-Inhibitor, der unter Auflagen zur *second line*-Therapie bei metastasierendem Mamma-Karzinom zugelassen ist, wenn eine Überexpression der HER2-Rezeptor-Tyrosinkinase nachgewiesen wurde. Weitere Vertreter sind Imatinib (Glivec®) bei chronischer myeloischer Leukämie (CML) und Erlotinib (Tarceva®) bei nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (74).

Für experimentelle Zwecke steht mit Genistein ein potenter Inhibitor der Tyrosinkinaseaktivität des EGF-Rezeptors und Src-Tyrosinkinasen zur Verfügung. Es handelt sich dabei um ein Isoflavon, das in verschiedenen Pflanzen und im Kulturmedium von *Pseudomonas sp.* vorkommt. Genistein bildet einen nicht-funktionellen Enzymsubstratkomplex und verdrängt ATP von seiner Bindungsstelle,

wobei es zwischen den katalytischen Domänen von Serin/Threonin-Kinasen und Tyrosinkinasen unterscheiden kann.

1.6.3 Lipidkinasen

Neben der Signaltransduktion durch phosphorylierte Proteine ist auch der unterschiedliche Phosphorylierungsgrad von Lipiden von großer Bedeutung für bestimmte intrazelluläre Signalkaskaden. Enzyme, die eine solche Phosphatgruppenübertragung katalysieren, bezeichnet man als Lipidkinasen. Eine wichtige Untergruppe dieser Familie bilden die sogenannten PI3-Kinasen (Phosphoinositid-3-Kinasen); diese katalysieren die Phosphorylierung der 3-OH-Gruppe des Inositolrings von inositolhaltigen Lipiden und geben somit im Sinne eines *second messenger*-Systems Signale von der Zelloberfläche ins Innere der Zelle weiter.

PI3-Kinasen sind heterodimere Lipidkinasen, die aus einer katalytischen p110- und einer regulatorischen p85-Untereinheit bestehen. Zunächst wird Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) von der katalytischen Untereinheit zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) phosphoryliert; hieran schließen sich weitere Phosphorylierungsschritte an, die letztlich in einer Aktivierung der Serin/Threoninkinase Akt (synonym: Proteinkinase B) münden. Diese phosphoryliert und reguliert zahlreiche Zielmoleküle, z. B. weitere Kinasen, Transkriptionsfaktoren und andere regulatorische Moleküle (75, 76). Auch MAP-Kinasen können im Anschluss an die PI3-Kaskade aktiviert werden und ihrerseits verschiedenste Effekte hervorrufen. Von besonderer Relevanz scheint der PI3-Kinase-Weg für die Entstehung und den klinischen Verlauf verschiedener Krebserkrankungen zu sein. So fanden z.B. Li *et al.*, dass eine Mutation an dem für PI3-Kinasen codierenden Gen PIK3CA bei Brustkrebspatientinnen mit einer schlechten Prognose korreliert (77).

Für die vorliegende Arbeit war die Tatsache interessant, dass der PI3K/Akt-Weg offenbar in einigen Zellsystemen in Zusammenhang mit der durch Lipopolysaccharide hervorgerufenen Signalkaskade steht. Verschiedene Autoren beschreiben, dass entweder die PI3-Kinase durch LPS heraufreguliert oder der von LPS hervorgerufene biologische Effekt durch einen PI3K-Inhibitor abgeschwächt wurde (78-80).

Als Inhibitoren der PI3-Kinasen stehen Wortmannin und LY 294002 zur Verfügung. Beide sind relativ spezifisch, hemmen jedoch auch andere Kinasen der PI3K-Superfamilie (72).

1.6.4 NFκB

Viele der oben beschriebenen Signalwege münden letztendlich in die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB (NF = *nuclear factor*). Zur NFκB/Rel-Familie gehören fünf verschiedene Proteine: NFκB1 (p50/p105), NFκB2 (p52/p100), p65 (RelA), RelB, und c-Rel. Jeweils zwei dieser Untereinheiten bilden zusammen ein Homo- oder Heterodimer; am häufigsten kommen Heterodimere von p50 oder p52 mit p65 vor (81).

Der NFκB-Signalweg wird durch verschiedene Stimuli aktiviert, beispielsweise durch Zytokine, freie Radikale, virale und bakterielle Produkte (z. B. LPS), UV-Strahlung uvm. (82) NFκB existiert im Zytoplasma als inaktive Form und ist mit regulatorischen Proteinen verbunden, die als IκB (*inhibitors of κB*) bezeichnet werden. Wenn IκB auf ein spezifisches Signal hin von der IKK (IκB-Kinase) phosphoryliert wird, entlässt es ein NFκB-Dimer ins Zytoplasma und wird selbst durch ein Proteasom abgebaut. Daraufhin kommt es zu einer Translokation des nun ungebundenen Transkriptionsfaktors in den Zellkern, wo er an die entsprechende Sequenz seiner Zielgene – das sogenannte κB-Motiv – binden und deren Expression verändern kann (81). Diese Gene sind z. B. für die Produktion von Zytokinen, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen und Akute-Phase-Proteinen, für Proliferation und Apoptose zuständig. Eine gestörte Funktion des NFκB-Signalwegs wurde mit zahlreichen Krankheiten in Verbindung gebracht, z. B. mit Asthma bronchiale, Rheumatoider Arthritis, Septischem Schock, Lungenfibrose sowie zahlreichen Autoimmunerkrankungen.

1.7 Ingwer

1.7.1 Allgemeines

Ingwer (*Zingiber officinale* ROSCOE) aus der Familie der Zingiberaceae ist wie andere Arten der Gattung *Zingiber* eine weitverbreitete traditionell angewendete Arznei- und Gewürzpflanze; officinell ist jedoch nur das Rhizom von *Zingiber officinale* var. *macrorrhizomum*. Die zweite Varietät *Zingiber officinale* var. *rubens*, die auch als Kintoki-Ingwer bezeichnet wird, zeigt ein deutlich abweichendes Inhaltsstoffspektrum und wird daher in den Arzneibüchern nicht berücksichtigt (83). Beheimatet ist die Ingwerpflanze im tropischen Südostasien, wobei die Wildform jedoch unbekannt ist (84). Die industriell genutzte Pflanze wird heute vor allem in Indien, China, Malaysia und Nigeria angebaut; auch in Australien, Jamaika und anderen tropischen Gebieten finden sich die klimatischen Voraussetzungen zur Ingwerzucht (83). Die Drogenimporte stammen heute größtenteils aus Süd-China (84).



Abbildung 1.4: Abbildung aus Köhler's Medizinal-Pflanzen

Abgebildet sind der Wurzelstock mit Trieben, Blättern und Blüten; außerdem Bestandteile der Blüten und des Fruchtknotens (kleine Bilder).

Abhängig vom Anbaugebiet und von der Weiterverarbeitung nach der Ernte stehen heute zahlreiche Handelssorten des Rhizoms zur Verfügung, die sich in Geschmack und Qualität z. T. deutlich unterscheiden. Den Anforderungen des Arzneibuchs entspricht der Jamaika-Ingwer, der jedoch auf Grund der aufwändigen Verarbeitung nur schwer erhältlich ist; als ebenfalls sehr gute Sorten gelten der Australische und der Bengalische Ingwer (84).

Die Stammpflanze ist ein ausdauerndes Kraut, das über ein horizontal wachsendes unterirdisches Rhizom verfügt. Der knollenförmige Wurzelstock verzweigt sich in mehrere Seitensprosse. Die oberirdischen Organe bestehen aus einem 1 bis 2 m hohen, jährlich neu gebildeten sterilen Scheinstengel und gegenständigen, lineallanzettlichen Blättern. Die zygomorphen Blüten sind gelb gefärbt und von dachziegelartig übereinander liegenden Deckblättern umgeben. Blätter, Blüten und Früchte werden nur selten verwendet (85).

Die Droge *Zingiberis rhizoma* ist der ungeschälte oder vom Kork befreite, getrocknete oder frische Wurzelstock von *Zingiber officinale*. Die im Handel befindlichen Rhizomstücke sind sympodial verzweigt, seitlich abgeflacht und in der Regel 10-15 cm lang und ca. 4 cm breit (siehe Abb. 1.5). Die Arzneibuchdroge besteht aus kleineren Rhizomstücken, deren Oberfläche fein längs gestreift und von gelblich-grauer Farbe ist. Die Droge weist einen charakteristischen, aromatischen Geruch auf und schmeckt brennend scharf (84).



Abbildung 1.5: Ingwerwurzelstock (*Zingiberis rhizoma*)

1.7.2 Inhaltstoffe

Neben zahlreichen Stärkekörnern, die auf Grund ihrer charakteristischen sackförmigen Gestalt zur mikroskopischen Prüfung der Droge herangezogen werden können, befinden sich in der Rinde und im Zentralzylinder des Rhizoms oleoresinhaltige Zellen.

Das Oleoresin ist ein zähflüssiger Balsam und zu etwa 5-8 % in der Droge enthalten. Zu 20-25 % besteht es aus ätherischem Öl, das je nach Herkunft der Droge sehr unterschiedlich zusammengesetzt ist. Sesquiterpene wie α -Zingiberen und das daraus bei der Lagerung entstehende ar-Curcumen stellen meist die Hauptbestandteile dar; auch Monoterpene wie Citral, α -Pinen, β -Phellandren u.v.m. kommen vor, die das Aroma maßgeblich bestimmen. Insgesamt wurden im ätherischen Öl bisher über 150 Komponenten nachgewiesen (86). Untersuchungen zur Charakterisierung des ätherischen Ingweröls und genaue Beschreibungen der Zusammensetzung finden sich bei Heimes (87) und Riyazi (88). Das EuAB gibt für *Zingiberis rhizoma* einen Mindestgehalt an ätherischem Öl von 15 ml/kg an.

Neben dem ätherischen Öl enthält das Oleoresin nichtflüchtige Scharfstoffe, die zur Gruppe der Gingerole und Shogaole gehören (*shoga* ist das japanische Wort für Ingwer). Es handelt sich jeweils um eine homologe Reihe mit unterschiedlich vielen C-Atomen – je nachdem, welche Fettsäure im Verlauf der Biosynthese eingebaut wird. Shogaole entstehen durch Dehydratisierung von Gingerolen während der Lagerung der Droge bzw. des Oleoresins; somit ermöglicht es das Verhältnis von der Gingerol- zur Shogaolkonzentration, die Frische des Ingwers zu bestimmen (84). Ein erhöhter Shogaolgehalt führt jedoch nicht zu einer verminderten 5-HT₃-Rezeptor-Aktivität und Antiemesis.

1.7.3 Pharmazeutische Verwendung

Neben der Verwendung als Gewürz – unter anderem in der Getränke- und Süßwarenherstellung – wurde Ingwer seit dem Altertum von den verschiedensten Kulturen zur Bekämpfung von Durchfall, Husten, asthmatischen Beschwerden, Übelkeit u. a. eingesetzt. Karibische Fischer verwenden Ingwer seit Jahrhunderten zur Vorbeugung der Seekrankheit (86). Die antiemetische Wirkung ist durch klinische Studien gut belegt. Im Rahmen von früheren Dissertationen im Arbeitskreis Verspohl wurde gezeigt, dass Ingwer und mehrere seiner Bestandteile (ätherisches Öl, Scharfstoffe) antagonistisch am 5-HT₃-Rezeptorkanalsystem wirken; dies erklärt die antiemetische Wirksamkeit und rechtfertigt den Einsatz von Ingwer z. B. bei Reiseübelkeit, postoperativem und Chemotherapie-induziertem Erbrechen sowie bei Schwangerschaftsübelkeit (89-91). Im Handel ist das Präparat Zintona[®], das das pulverisierte Rhizom enthält. Die Kommission E sieht die Verwendung bei dyspeptischen Beschwerden und zur Verhütung der Symptome der Reisekrankheit als ausreichend belegt an (84).

1.7.4 Studienlage zur antiinflammatorischen Wirkung

Berichte zu antientzündlichen Effekten von Ingwerbestandteilen beziehen sich bisher hauptsächlich auf den Gesamtextrakt oder auf die Scharfstofffraktion. Levy *et al.* beschreiben eine protektive Wirkung des [6]-Shogaols vor einer Kniegelenksentzündung bei arthritischen Ratten und erklären diesen Effekt u. a. damit, dass die Substanz an Makrophagen die LPS-induzierte Produktion von TNF α , Interleukin-1 β und NO hemmt (92, 93). Auch andere Autoren berichten, dass Ingwerextrakte an stimulierten Makrophagen und Monozyten die Sekretion verschiedener proinflammatorischer Zytokine und Chemokine hemmen (94-96). Ebenso wie [6]-Shogaol inhibieren verschiedene Gingerole an polymorphkernigen Neutrophilen die Bildung von Sauerstoffradikalen und an Makrophagen die durch LPS vermittelte Produktion von NO und PGE₂ (97). Des Weiteren vermindert topisch angewandtes [6]-Gingerol auf der Haut von Mäusen die durch Phorbol ester stimulierte Expression der COX-2, indem es die Aktivität von NF κ B sowie die Phosphorylierung von p38-MAPK hemmt (98). Die Hemmung der Cyclooxygenase und der Lipoxygenase durch verschiedene Ingwerkomponenten ist durch zahlreiche Untersuchungen belegt (Übersicht z. B. bei (99)). Diese Erkenntnisse erklären die traditionelle Anwendung von Ingwerzubereitungen bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises (100).

Die immunmodulatorische Wirkung des ätherischen Ingweröls wurde z. B. von Zhou *et al.* untersucht, die nachweisen konnten, dass das Öl die Sekretion von Interleukin-1 α aus murinen Makrophagen vermindert (101).

Obwohl Ingwer traditionell seit langem auch bei Atemwegserkrankungen eingesetzt wird, ist die Studienlage in diesem Bereich sehr dünn. [6]-Gingerol hemmt die Induktion eines für das Mucin MUC5AC kodierenden Gens in Atemwegsepithelzellen, nachdem diese mit Interleukin-1 β stimuliert wurden (102). Außerdem schwächen Ingwerextrakte die Acetylcholin-induzierte Kontraktion von glatten Atemwegsmuskelzellen der Maus (103). Bezüglich der protektiven Wirkung des Ingwers oder seiner Bestandteile auf die LPS-vermittelte Zytokinsekretion humaner Bronchialepithelzellen finden sich in der Literatur bisher keine Anhaltspunkte.

1.8 Stickstoffmonoxid

Bei Stickstoffmonoxid handelt es sich um ein farbloses, giftiges Gas mit der chemischen Formel NO. Auf Grund eines ungepaarten Elektrons am Stickstoff verfügt es über radikalische Eigenschaften und gehört zur Gruppe der Reaktiven Stickstoffspezies (RNS, *reactive nitrogen species*).

Schon seit dem 19. Jahrhundert wurde Glyceroltrinitrat (auch als Nitroglycerin bezeichnet) zur Behandlung der Angina pectoris eingesetzt, wobei man sich dessen vasodilatierende Wirkung zunutze machte – ohne jedoch zu wissen, dass dabei NO freigesetzt wird. Sogar Alfred Nobel, der den Nitroglycerin enthaltenden Sprengstoff Dynamit erfunden hatte, bekam dieselbe Substanz im Alter als Arzneimittel verschrieben. Er schrieb dazu an einen Freund: „Es klingt wie Ironie des Schicksals, dass man mir Nitroglycerin innerlich verschrieben hat. Sie haben es Trinitrin genannt, um die Apotheker und die Öffentlichkeit nicht zu beunruhigen.“(104)

Zunächst war jedoch unbekannt, dass NO auch endogen gebildet werden kann. Erst in den 1980er Jahren stellte Robert Furchgott fest, dass mehrere vasodilatierende Arzneistoffe ihre relaxierende Wirkung auf die mit Acetylcholin kontrahierte glatte Gefäßmuskulatur verlieren, wenn den Gefäßen zuvor das Endothel entfernt wurde. Daraus schloss er, dass die Substanzen nicht direkt vasodilatierend wirkten, sondern die Endothelzellen zur Freisetzung eines noch unbekanntes Stoffes anregen, den er als *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) bezeichnete (105). Parallel hatten Murad *et al.* gezeigt, dass die vasodilatierende Wirkung organischer Nitrate auf einer Freisetzung von NO und anschließender Aktivierung der Guanylylcyclase beruht (106).

Furchgott und Louis J. Ignarro stellten 1986 auf einer Konferenz unabhängig voneinander Ergebnisse vor, die nahelegten, dass EDRF und NO identisch seien. Den Beweis für diese zunächst sehr umstrittene Behauptung lieferte die Gruppe um Salvador Moncada 1987, indem sie unzweifelhaft zeigten, dass Endothelzellen NO produzieren und dadurch die Gefäßmuskulatur relaxieren (107). Dennoch ging der Nobelpreis für Medizin 1998 lediglich an Furchgott, Ignarro und Murad; Moncada ging leer aus.

Neben der Induktion der Endothel-abhängigen Vasodilatation hemmt NO die Plättchenaggregation und die Monozytenadhäsion. Außerdem vermindert es die Proliferation glatter Muskelzellen und hat antioxidative Effekte, wodurch die Bildung von Superoxidradikalen sowie die Oxidation von LDL abgeschwächt werden. Man kann NO also als „endogenes anti-atherogenes Molekül“ bezeichnen (108).

1.8.1 NO-Synthasen

Erste Hinweise darauf, dass Säugetiere zur Bildung von Stickoxiden aus Arginin in der Lage sind, fanden Green *et al.* 1981 zunächst an Ratten (109), kurz darauf auch an Menschen (110). Des Weiteren wurde festgestellt, dass Makrophagen der Maus als Reaktion auf von *E. coli* stammende Lipopolysaccharide Nitrat und Nitrit produzieren (111). Vorher war man davon ausgegangen, dass derartige Synthesen nur bei bestimmten Bakterien vorkommen. Nachdem man zunächst nur die oxidierten Formen Nitrat und Nitrit fand, wies Marletta 1988 nach, dass NO als Zwischenprodukt auftritt (112).

Stickstoffmonoxid wird durch einen Fünf-Elektronen-Übergang aus dem Guanidinium-Stickstoff des L-Arginins gebildet (107). Das diese Reaktion katalysierende lösliche Enzym ist die NO-Synthase, die auf die Anwesenheit sowohl von Sauerstoff als auch von NADPH als Cofaktoren angewiesen ist (113). Eine Zwischenstufe ist hierbei das N^G -Hydroxy-L-Arginin. Während der Reaktion entsteht als Nebenprodukt L-Citrullin im äquimolaren Verhältnis zu NO (114).

Von der NO-Synthase wurden bisher drei Isoformen beschrieben. Konstitutiv sind das neuronale (nNOS, Isoform I) und das endotheliale (eNOS, Isoform III) Isoenzym, das dritte ist z. B. durch Zytokine induzierbar (iNOS, Isoform II). Die Nummerierung entspricht der Reihenfolge der Entdeckung.

Die neuronale NOS ist vor allem im Gehirn konstitutiv vorhanden und wurde zuerst im Kleinhirn der Ratte entdeckt. Neben NADPH, Arginin und Calciumionen benötigt sie auch Calmodulin als Cofaktor (115). Das Enzym ist stark konserviert; die Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz zwischen Ratte und Mensch liegt bei 93 %. Das Gen für die menschliche nNOS befindet sich auf Chromosom 12 (116). Es handelt sich um ein Homodimer mit einer Größe von 155 kDa pro Untereinheit (115). Phosphoryliert und damit in seiner Aktivität verändert wird das Enzym u. a. von der Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II und der Proteinkinase C (117). Schmidt *et al.* wiesen das zunächst im Gehirn entdeckte Enzym bei der Ratte in zahlreichen Zellen und Geweben nach, indem sie einen spezifischen monoklonalen Antikörper gegen die nNOS aus dem Rattenhirn verwendeten. Neben Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems gehörten Gliazellen, Langerhans-Inseln, Epithelzellen von Lunge, Uterus und Magen sowie Macula-densa-Zellen der Niere dazu (118). Im zentralen Nervensystem spielt NO in der Regulation des Blutdrucks eine wichtige Rolle. So hängt z. B. die Übertragung des Barorezeptorreflexes durch den Nucleus tractus solitarii von der Aktivität der nNOS ab; eine spezifische Hemmung des Enzyms führt bei Ratten zu erhöhtem Blutdruck und einer verminderten Reaktion auf Reizung der

Barorezeptoren (119). Auch auf Lernvorgänge und Verhaltensmuster scheint die neuronale NO-Synthase Einfluss zu haben (120, 121). nNOS kommt des Weiteren in vielen nicht adrenergen, nicht cholinergen Nerven vor (NANC-Neurone), in denen NO – neben anderen Substanzen – als Neurotransmitter fungiert (122).

Ebenfalls konstitutiv ist die endotheliale NO-Synthase, sie kann aber doch durch verschiedene Faktoren reguliert werden. So steigt die Expression des entsprechenden Gens z. B. bei erhöhter Scherbeanspruchung durch den Blutfluss (123). Im Gegensatz zur neuronalen Isoform scheint sie relativ spezifisch für Epithelzellen zu sein. Sie wurde in arteriellem und venösem Endothel zahlreicher menschlicher und tierischer Gewebe nachgewiesen (124). NO ist im Gefäßendothel ein hochpotenter Vasodilatator, der als Gegenspieler zur sympathomimetisch verursachten Vasokonstriktion fungiert; daher führt die Blockade der NO-Synthase durch inhibitorische Arginin-Analoga in verschiedenen Spezies zu Gefäßverengung und erhöhtem Blutdruck. Des Weiteren wirkt NO in Gefäßen antiproliferativ und hemmt die Plättchenaggregation und -adhäsion an der Gefäßwand, weshalb eine Blockade der NO-Synthase zur Entstehung von Atherosklerose beitragen kann (125). Ein intaktes Endothel mit funktionierender NO-Produktion kann also als wichtiger Schutzmechanismus vor der Entstehung atherosklerotischer Veränderungen der Gefäßwand angesehen werden. Wie die nNOS wird auch die eNOS durch einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und Calmodulin reguliert.

Obwohl die neuronale und endotheliale NOS konstitutiv sind, kann ihre Expression dennoch unter bestimmten physiologischen und pathologischen Bedingungen reguliert werden.

Im Gegensatz zu den beiden beschriebenen Isoformen ist das Isoenzym II nicht permanent vorhanden, sondern wird auf Transkriptionsebene durch verschiedene Zytokine und Lipopolysaccharide reguliert. Nach der Expression kann es jedoch nicht weiter reguliert werden. Es wurde in verschiedenen Zelltypen und Geweben nachgewiesen, u. a. in Makrophagen der Lunge und der Nebennieren, Eosinophilen, Mastzellen und intestinalen Endothelzellen (125).

Bei Makrophagen stellt die Produktion von NO in großen Mengen ein wichtiges zytotoxisches Prinzip gegen Mikroorganismen, apoptotische Zellen und Tumorzellen dar. Es können jedoch auch gesunde Zellen geschädigt werden, was einen Beitrag der iNOS zu Autoimmunerkrankungen vermuten lässt.

1.8.2 Die Bedeutung von NO für den Respirationstrakt

Alle drei beschriebenen Isoformen der NO-Synthase werden im Respirationstrakt exprimiert. Das endotheliale Isoenzym eNOS wurde z. B. im Bronchial-, Alveolar- und Nasenepithel des Menschen nachgewiesen. Ein Beitrag zur Regulation der ziliären Schlagfrequenz (*ciliary beat frequency*, CBF) wird angenommen (126, 127).

Die neuronale NOS kommt in den Atemwegen z. B. in Nervenbahnen vor, die die glatte Muskulatur innervieren. Die Freisetzung von NO führt wie am Gefäßendothel zu einer Relaxation der glatten Muskulatur und reguliert somit die Weite der Trachea, wodurch der Atemwiderstand beeinflusst wird (128).

Der Tonus der Bronchialmuskulatur wird nicht nur adrenerg und cholinerg reguliert, sondern auch von sogenannten NANC-Bahnen (*non-adrenergic non-cholinergic*). Diese tragen als inhibitorische (iNANC) und exzitatorische (eNANC) Form zur Relaxation bzw. Kontraktion der glatten Trachealmuskulatur bei. NO fungiert als Neurotransmitter in inhibitorischen NANC-Bahnen und führt somit nach seiner Calcium-vermittelten Freisetzung aus peripheren Nerven zur Muskelrelaxation (129).

Alberty *et al.* wiesen 2004 eine LPS- und TNF α -vermittelte Induktion der iNOS in der apikalen Region ziliärentragender Zellen des Nasenepithels nach und konnten außerdem zeigen, dass eine Hemmung der NO-Synthase durch das Arginin-Analogon L-NAME (*N*^G-Nitro-L-Argininmethylester) den CBF-steigernden Effekt der Zytokinstimulation wieder aufhebt. In unstimulierten Zellen war der Effekt des L-NAME viel geringer. Die vermehrte Expression inflammatorischer Zytokine (z. B. TNF α) bei Patienten mit allergischer Rhinitis könnte also im Hinblick auf die Zilienschlagfrequenz zu einer höheren Empfindlichkeit gegenüber dem NO-System führen (130).

Des Weiteren wird eine Beteiligung der NOS an der pränatalen Lungenreifung angenommen. Ein deutlicher Anstieg der eNOS in der fetalen Lunge fällt zeitlich mit einer Phase starken Lungenwachstums und vermehrter Angiogenese zusammen. Shaul *et al.* stellten die These auf, dass ein Anstieg der NOS zu Beginn des dritten Trimenons bei Pavianen mit einer verbesserten Lungenfunktion unmittelbar nach der Geburt einhergeht (131).

Bei Patienten mit atopischem Asthma wurden im Vergleich zu gesunden Probanden erhöhte NO-Anteile in der Ausatemluft gemessen (132). Die bei entzündlichen Erkrankungen verstärkt gebildeten proinflammatorischen Zytokine induzieren die iNOS und erhöhen somit die NO-Produktion; dies kann jedoch durch die Verabreichung von Glucocorticoiden abgeschwächt werden. Allerdings scheint auch eine Mutation am für die eNOS codierenden Gen z. T. am erhöhten NO-Anteil in der Ausatemluft von Asthmatikern beteiligt zu sein (133). Die NO-Messung in der Ausatemluft stellt ein

vielversprechendes Verfahren zur schnellen und nichtinvasiven Diagnostik und zum Monitoring des Krankheitsverlaufes bei Asthmatikern dar (134).

Bei Rhinitis, COPD, Bronchiektasien und Abstoßungsreaktionen der Lunge werden ebenfalls erhöhte NO-Spiegel in der Ausatemluft gemessen; bei Patienten mit Cystischer Fibrose oder pulmonaler Hypertension sind die Werte erniedrigt (135). Bei letzteren kann eine inhalative Gabe von NO den Lungenhochdruck ohne nennenswerte Auswirkungen auf die systemische Zirkulation verringern (136).

Mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die entweder durch verschiedene Prozesse endogen gebildet oder auch eingeatmet werden können, formiert sich NO zu sogenannten RNS, reaktiven Stickstoffspezies. Obwohl diese Radikale für zahlreiche physiologische Prozesse essenziell sind, beispielsweise für die Abwehr von Mikroorganismen, kann eine verstärkte Bildung zu Schäden an gesunden Strukturen führen, v. a. bei einem Mangel an Antioxidantien. Wenn NO beteiligt ist, spricht man in Analogie zum oxidativen Stress von „nitrosativem Stress“. ROS und RNS schädigen z. B. DNA, Lipide, Proteine und Kohlenhydrate und können so die Zellfunktion beeinträchtigen und inflammatorische Reaktionen verstärken (135). Neben endogenen Prozessen verstärkt auch die Inhalation von Ozon, Stickoxiden, Zigarettenrauch und Staubpartikeln die Bildung von RNS (137).

Die vielfältigen Funktionen von NO in der Physiologie und Pathophysiologie der Lunge könnten also in der Zukunft pharmakologische Optionen bei der Regulation verschiedenster respiratorischer Erkrankungen mit sich bringen.

1.8.3 Asymmetrisches Dimethylarginin

Asymmetrisches Dimethylarginin ist eine endogene Substanz und wurde erstmals 1992 von Vallance *et al.* mit pathophysiologischen Vorgängen in Verbindung gebracht. Die Gruppe stellte fest, dass ADMA die NO-Synthase hemmt. Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Endstadium ist die renale Ausscheidung von ADMA stark verringert und der Plasmaspiegel somit erhöht. Die daraus resultierende Hemmung der NO-Synthase könnte eine Erklärung für den erhöhten Blutdruck und die beschleunigte Entstehung von Atherosklerose bei diesen Patienten sein (138). Umgekehrt konnte nachgewiesen werden, dass eine Behandlung mit Arginin, dem Substrat der NO-Synthase und endogenen Gegenspieler des ADMA, bei hypercholesterämischen Patienten zu einer verbesserten Endothelfunktion führt (139). Erhöhte ADMA-Konzentrationen wurden bei Patienten z. B. mit Hypercholesterinämie, Atherosklerose, Hypertonie, chronischer Nieren- oder Herzinsuffizienz beobachtet (108). Über die Plasmaspiegel von Asthmatikern ist bisher nichts beschrieben.

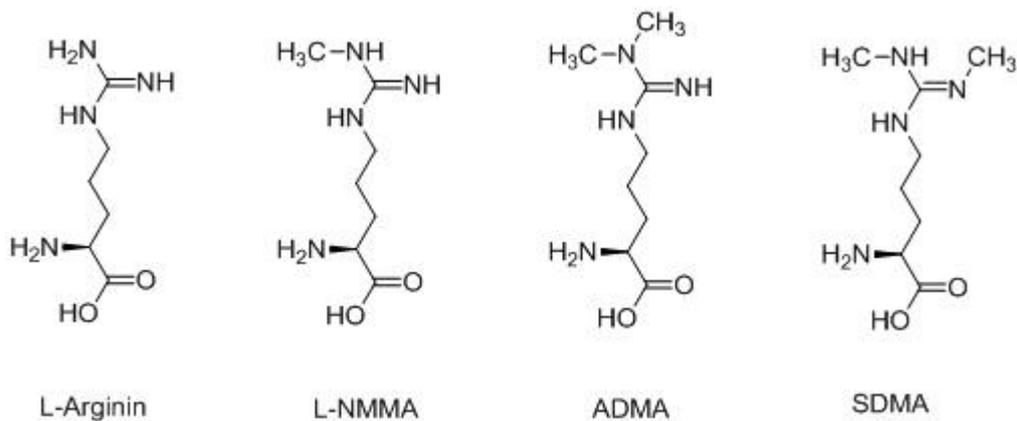


Abbildung 1.6: Strukturformeln von Arginin-Analoga

Strukturformeln von L-Arginin, dem natürlichen Substrat der NO-Synthase, den kompetitiven Inhibitoren L-NMMA (N^G -Monomethyl-L-Arginin) und ADMA (N^G, N^G -Dimethyl-L-Arginin) sowie dem inaktiven SDMA ($N^G, N^{G'}$ -Dimethyl-L-Arginin)

ADMA wird endogen als Abbauprodukt des Arginins gebildet. Im menschlichen Organismus werden pro Tag ca. 300 μmol ADMA synthetisiert (140). Dabei werden Argininreste in Proteinen durch die Enzyme PRMT I und II (Protein-Arginin-N-Methyltransferasen) methyliert, wobei S-Adenosylmethionin als Methylgruppendonor fungiert. Durch Hydrolyse werden anschließend die mono- und dimethylierten Argininderivate freigesetzt. PRMT Typ I katalysiert dabei die Bildung von L-NMMA (N^G -Monomethyl-L-Arginin) und ADMA, wohingegen Typ II zur Entstehung von L-NMMA und SDMA (symmetrisches Dimethylarginin) führt. Das zu ADMA stereoisomere SDMA ist im Hinblick auf die NO-Synthase-Hemmung inaktiv. PRMT I, das also hauptsächlich für die ADMA-Bildung verantwortlich ist, wird in Endothelzellen von oxidierten low-density-Lipoproteinen (LDL) heraufreguliert, sodass vermehrt ADMA entsteht (141). Da ADMA die Adhäsion von Monozyten an das Endothel fördert (142), erscheint ein Zusammenhang mit der Entstehung von Atherosklerose wahrscheinlich.

90 % des ADMA wird durch das Enzym DDAH (Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase), das in zwei Isoformen existiert, zu Citrullin und Dimethylamin abgebaut. DDAH I kommt in Geweben vor, die die neuronale NO-Synthase exprimieren, DDAH II ist dagegen mit der endothelialen NO-Synthase colokalisiert. Eine verminderte DDAH-Aktivität und somit ein verringerter Abbau von ADMA könnte ein Mechanismus für die erhöhten ADMA-Spiegel bei kardiovaskulären Patienten sein (143).

L-Arginin ist das natürliche Substrat der NO-Synthasen; ADMA fungiert als kompetitiver Inhibitor des Enzyms. Die NO-Synthase besteht aus einer Oxigenase- und einer Reduktase-Domäne. Wenn L-Arginin sowie verschiedene Co-Faktoren (Tetrahydrobiopterin, Calmodulin, NADPH, FMN und FAD) in optimalen Konzentrationen vorhanden sind, werden Elektronen von molekularem Sauerstoff über die Co-Faktoren auf L-Arginin übertragen; dabei entstehen NO und Citrullin. Ein relativer Mangel an L-Arginin, der z. B. durch erhöhte ADMA-Konzentrationen zustande kommt, kann zu einer sogenannten „Entkopplung“ des Enzyms führen: Der Elektronenfluss ist gestört, sodass O₂ als Elektronenakzeptor fungiert. Hierdurch entstehen Superoxidradikale, die zu verschiedenen inflammatorischen und atherogenetischen Prozessen beitragen. Dies bietet einen Erklärungsansatz für die Rolle von ADMA als kardiovaskulärem Risikofaktor (108).

Auf Grund der zentralen Rolle, die NO bei vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen spielt, liegt es nahe, dass eine Hemmung der NO-Synthese durch ADMA vielfältige Konsequenzen mit sich bringt. Klassische Risikofaktoren wie Rauchen, Übergewicht, Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie liefern nicht bei allen Patienten eine Erklärung für die Entstehung kardiovaskulärer Ereignisse. Hier könnte die Überwachung des ADMA-Spiegels einen neuen diagnostischen und – eventuell durch Supplementierung des ADMA-Gegenspielers L-Arginin – therapeutischen Ansatz darstellen, da ein erhöhter ADMA-Spiegel als unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor gelten kann.

1.8.4 Beeinflussung der Zytokinproduktion durch ADMA

Versuche zur Auswirkung von ADMA auf die Zytokinexpression wurden von anderen Arbeitsgruppen zunächst hauptsächlich an Gefäßendothelzellen durchgeführt. Böger *et al.* zeigten, dass ADMA an Endothelzellen die Bildung von MCP-1 sowie eine Aktivierung von NFκB bewirkt. Außerdem erhöht eine Vorinkubation mit ADMA konzentrationsabhängig die Monozytenadhäsion am Gefäßendothel und stimuliert die Bildung von Sauerstoffradikalen (142). Chen *et al.* bestätigten diese Ergebnisse und wiesen darüber hinaus nach, dass auch die Bildung der proinflammatorischen Zytokine TNFα und IL-8 – welches auch als Trigger für die Monozytenadhäsion wirkt – in Endothelzellen durch ADMA stimuliert wird (144). ADMA scheint also an bestimmten Systemen selbst als proinflammatorischer Faktor zu fungieren, der einen Beitrag zur Entstehung von Atherosklerose und Schäden am Gefäßendothel leistet.

Zur Rolle von ADMA in der Lunge bzw. im Bronchialsystem wurden bisher wenige Untersuchungen publiziert. Es konnte aber gezeigt werden, dass ADMA in einer

murinen Lungeneithelzelllinie oxidativen und nitrosativen Stress erzeugt, indem es die Produktion von Superoxid- und Peroxinitrit-Anionen erhöht (145). Die Bildung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies durch ADMA könnte auf dessen Beteiligung an inflammatorischen Atemwegserkrankungen, wie z. B. Asthma, hindeuten. Dieselbe Arbeitsgruppe um Wells *et al.* berichtet des Weiteren von verschiedenen physiologischen Veränderungen in den Lungen von Mäusen, die über zwei Wochen kontinuierlich subkutan mit ADMA behandelt wurden. Unter anderem zeigte sich bei der histologischen Untersuchung des Lungengewebes ein erhöhter Kollagengehalt sowie eine vermehrte Arginaseaktivität; außerdem war die respiratorische Reaktion auf eingeatmetes Methacholin verringert (146).

1.9 Einfluss von ADMA auf die Zilienschlagfrequenz

Der mukoziliäre Transport in den Atemwegen stellt einen wichtigen Abwehrmechanismus gegen Krankheitserreger und eingeatmete Partikel dar, indem er die Oberfläche der respiratorischen Mucosa von Verunreinigungen befreit. Gemessen wird der Transport gemeinhin mit Hilfe der ziliären Schlagfrequenz (CBF). Die CBF wird durch verschiedene physiologische und pathophysiologische Mechanismen beeinflusst. Z. B. erhöht NO, das unter bestimmten Bedingungen (Entzündungen, mechanische Beanspruchung etc.) von der iNOS im respiratorischen Epithel vermehrt gebildet wird, die Schlagfrequenz. Bei Patienten mit allergischer Rhinitis ist die Expression der iNOS und somit auch die CBF erhöht (130).

Jain *et al.* wiesen erstmals an bovinen Bronchialepithelzellen eine Beteiligung von NO an der CBF nach. Nach Stimulation mit Isoprenalin, Bradykinin oder Substanz P konnte der resultierende Anstieg der CBF durch die NO-Synthase-Inhibitoren L-NAME und L-NMMA wieder aufgehoben werden. Eine Zugabe von L-Arginin (L-NAME und L-NMMA sind kompetitive Antagonisten von L-Arginin an der NO-Synthase) kehrte den Effekt wieder um (126).

Auch andere Autoren beschrieben eine CBF-senkende Wirkung von NO-Synthasehemmern, wenn die Schlagfrequenz vorher durch proinflammatorische Substanzen (TNF α , Lipopolysaccharide) erhöht worden war (147). Indirekt ist dies ein Hinweis auf die Beteiligung von NO an der Regulation der CBF: Wenn L-NAME an mit TNF α und LPS stimulierten Naseneithel explantaten die CBF stärker senkt als an unstimulierten Proben, muss vorher eine Heraufregulation der NOS stattgefunden haben, die jetzt durch den Inhibitor L-NAME wieder rückgängig gemacht wird. Dass die iNOS durch TNF α und LPS im Naseneithel hochreguliert wird, wiesen Alberty *et al.* ebenfalls nach. Ein direkter Nachweis, dass die CBF durch eine z. B. 24-stündige

Inkubation mit TNF α /LPS erhöht wird, ist schwer möglich, da man die entsprechende zilienträgende Stelle unter dem Mikroskop am nächsten Tag nicht wiederfindet und die Frequenzen innerhalb eines Präparates stark schwanken.

ADMA ist ebenfalls ein Inhibitor der induzierbaren NO-Synthase und wird außerdem endogen gebildet. Bisher ist jedoch noch nicht beschrieben, ob sich eine Inkubation mit ADMA auf die CBF auswirkt.

1.10 NO-Beteiligung an der Kontraktion der Trachealmuskulatur

Stickstoffmonoxid wirkt durch die Aktivierung der Guanylylcyclase und die Freisetzung von cGMP relaxierend auf die glatte Muskulatur. Die für eine funktionierende Atmung essenzielle Regulation der Tracheaweite durch die glatte Trachealmuskulatur hängt somit u. a. mit dem NO-System zusammen.

An der glatten Muskulatur von Blutgefäßen wirkt ADMA durch die Hemmung der NO-Synthase kontrahierend, da das vasodilatierende NO in Anwesenheit von ADMA in geringerem Maße gebildet wird (148). Welche Auswirkungen ADMA an der glatten Muskulatur der Trachea hat, wurde bisher nicht gezeigt. Die Vermutung liegt jedoch nahe, dass auch hier kontrahierende Effekte an der glatten Muskulatur zu beobachten sind. Dies wäre ein Hinweis auf die Beteiligung von ADMA an Krankheiten, die mit einer Verengung der Atemwege zusammenhängen, wie z. B. Asthma und COPD.

1.11 Zielsetzung der Arbeit

Das Bronchialepithel stellt nicht nur eine mechanische Barriere für über die Atemwege eingedrungene Fremdstoffe dar, sondern ist darüber hinaus in der Lage, auf eingeatmete Pathogene mit der Ausschüttung von Zytokinen und anderen immunologisch aktiven Substanzen zu reagieren. Somit können z. B. Viren oder Bakterien direkt beim ersten Kontakt mit dem Epithel wirksam bekämpft werden, ohne dass erst eine Rekrutierung klassischer Immunzellen wie Monozyten aus dem Blut und deren Einwanderung ins Gewebe erforderlich ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie die humane Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B auf eine Inkubation mit Lipopolysacchariden reagiert. Als Indiz für eine immunologische Reaktion wurden die Ausschüttung von Interleukin-8 und RANTES und ferner die erhöhte Proliferation betrachtet.

Da für die Reaktion auf LPS in den meisten Fällen die Existenz des Mustererkennungsrezeptors CD14 auf der Zelloberfläche erforderlich ist, sollten die verwendeten BEAS-2B-Zellen auf das Vorhandensein dieses Antigens – sowohl in membranständiger als auch in löslicher, sezernierter Form – untersucht werden.

Neben der Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Interleukin-8-Ausschüttung sollte gezeigt werden, welche intrazellulären Signalkaskaden, die letztlich zur Zytokinsekretion und zur verstärkten Proliferation führen, nach dem Kontakt mit Lipopolysacchariden ablaufen. Dazu wurden den Reaktionsansätzen spezifische Inhibitoren des untersuchten Signalweges zugesetzt und aus einer Abschwächung des biologischen Effekts auf eine Beteiligung des entsprechenden Weges geschlossen. Außerdem sollte mit Hilfe eines speziellen Assays die Heraufregulierung verschiedener Kinasen beobachtet werden.

Da Bronchialepithelzellen *in vivo* nicht isoliert vorkommen, sondern immer in Wechselwirkung mit anderen Zellen – z. B. Monozyten – stehen, sollte untersucht werden, inwieweit eine gemeinsame Kultur von BEAS-2B-Zellen und der prämonozytischen Zelllinie U937 Einfluss auf die IL-8-Produktion nach LPS-Stimulation hat.

Der vielfältig eingesetzten Arzneipflanze Ingwer werden neben zahlreichen anderen, teils gut belegten Wirkungen auch antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben. Um diese näher zu charakterisieren, sollte der protektive Effekt von Ingwerextrakten auf mit LPS behandelte BEAS-2B-Zellen hinsichtlich der IL-8-Sekretion und der gesteigerten Proliferation getestet werden. Anschließend sollte gezeigt werden, welche Inhaltsstoffe für die inhibitorische Wirkung des Extraktes verantwortlich sind.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss des endogenen NO-Synthaseinhibitors ADMA auf verschiedene respiratorische Vorgänge zu untersuchen. Dafür wurde getestet, ob ADMA Auswirkungen auf die Kontraktion der isolierten Rattentrachea im Organbad hat, in BEAS-2B-Zellen eine Ausschüttung von IL-8, TNF α und anderen Zytokinen bewirkt oder eine veränderte Schlagfrequenz an den Zilien der Rattentrachea verursacht.

2 Material und Methoden

Chemikalien und Geräte, die wiederholt vorkommen, werden nicht mehrmals aufgeführt. Hier nicht genannte Geräte sind Bestandteil der üblichen Laborausstattung.

2.1 Zellkultur

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgt in 75 cm² Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C in einer Atmosphäre von 95 % Luft und 5 % CO₂. Eingefrorene Zellen werden in einem Kryobehälter in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Einfrieren wird dem Komplettmedium 7,5 % (V/V) DMSO zugesetzt.

Chemikalien	
LHC 9-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's PBS	PAA, Cölbe
Penicillin/Streptomycin, 100-fach	
Fetales Kälberserum (FCS gold)	
Trypsin/EDTA	
RPMI 1640 Medium	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Buchs, Schweiz
Humanes Fibronectin	Biochrom AG, Berlin
Kollagen A	
Bovines Serumalbumin (BSA)	Biomol, Hamburg

Geräte und Material	
Kryogefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Probenröhrchen 15 ml, 50 ml	
Zellkulturflaschen 75 cm ²	
Lichtmikroskop	Krüss, Hamburg
Zellkultur-Brutschrank HeraCell 240	Kendro-Heraeus, Berlin
Serologische Pipetten, 10 ml	Biochrom, Berlin
Autoklav 3170 ELV	Systec, Wettenberg
Neubauer-Zählkammer	LO Laboroptik, Friedrichsdorf

2.2 BEAS-2B-Zellen

Bei BEAS-2B-Zellen handelt es sich um eine immortalisierte humane Bronchialepithelzelllinie. Die normalen, nicht kanzerogenen Zellen wurden 1988 einem gesunden Spender entnommen und mit einem SV40-Adenovirus transfiziert (149). Unter Kulturbedingungen adhären sie und bilden einen einschichtigen Zellrasen. Trotz der Veränderung durch die Immortalisierung weisen die Zellen noch zahlreiche Eigenschaften nativer Bronchialepithelzellen auf, z. B. die typische Morphologie des Epithels sowie die Expression und polare Freisetzung von Zytokinen (150).

Nährmedium

Für die BEAS-2B-Zellen wird LHC 9 als Nährmedium verwendet. Dieses enthält unter anderem EGF (*epidermal growth factor*) und Insulin als Wachstumsfaktoren. Allerdings ist im Gegensatz zu vielen anderen Medien kein fetales Kälberserum enthalten, was für die Untersuchungen zur CD14-Expression und zur Reaktion der Zellen auf Lipopolysaccharide von großer Bedeutung ist. In einem serumhaltigen Medium wäre bereits lösliches CD14 vorhanden, sodass man nicht feststellen könnte, ob BEAS-2B Zellen selbst CD14 sezernieren bzw. auf ihrer Oberfläche exprimieren.

Dem Medium werden 100 I.U./ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt.

Kultivierung

BEAS-2B Zellen müssen einmal wöchentlich passagiert werden. Hierzu wird das alte Medium abgesaugt und die Zellen für drei bis vier Minuten im Brutschrank mit Trypsin/EDTA inkubiert, um die Zellen enzymatisch vom Flaschenboden zu lösen. Nach Abschlagen der Zellen unter Zugabe von 20 ml Medium wird die Suspension zentrifugiert und das erhaltene Pellet in frischem Medium resuspendiert. Nachdem die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt wurden, werden für die weitere Kultivierung 225.000 Zellen pro Flasche in 20 ml Medium ausgesät. Drei bis vier Tage nach dem Aussäen werden die Zellen mit frischem Medium weiterinkubiert. Für die Versuche zur Zytokinsekretion wurden jeweils 100.000 Zellen pro Well auf einer 24er-Platte ausgesät, für den Proliferations-Assay mit [³H]-Thymidin 25.000 Zellen pro Well (jeweils in 1 ml Medium).

Um ein Anhaften der Zellen am Flaschenboden zu ermöglichen, werden die Zellkulturflaschen vor dem Aussäen mindestens zwei Stunden mit 15 ml einer speziellen Imprägnierlösung behandelt. Dieselbe Lösung kann zur Imprägnierung mehrerer Flaschen verwendet werden. Sie setzt sich wie folgt zusammen:

Fibronectin	0,01 mg/ml
Kollagen	0,03 mg/ml
Bovines Serum-Albumin	0,01 mg/ml (in LHC-9 Medium)

2.2.1 U937-Zellen

Die humane hämatopoetische Zelllinie U937 wurde 1974 von Nilsson *et al.* etabliert. Sie entnahmen dazu Zellen aus dem Pleuraerguss eines Spenders, der an einem histiozytischen Lymphom erkrankt war (151). Es handelt sich hierbei um monozytäre Vorläuferzellen, die sich z. B. in Anwesenheit von Phorbolestern, Vitamin D₃, Interferonen, TNF α und Retinoiden zu voll differenzierten Monozyten entwickeln können (152-154). Auch die Inkubation mit Überständen von Lymphozytenkulturen führt zu einer solchen Differenzierung (155). Die hier verwendeten Zellen wurden jedoch nicht vor Gebrauch mit einer der oben angegebenen Substanzen differenziert.

Nährmedium

Das Nährmedium für die U937 Zellen besteht aus RPMI 1640 mit folgenden Zusätzen:

Penicillin	100 I.U.
Streptomycin	100 μ g/ml
Glutamin	2 mM
FCS	10 %.

Kultivierung

Die Zellen wachsen in Suspension, daher ist eine enzymatische Ablösung mit Trypsin/EDTA vor der Passage nicht nötig. Sie werden in einer Dichte von 200.000 bis 1.000.000 Zellen pro ml gehalten. Nach ca. 3-4 Tagen wird die Zellsuspension 1:10 mit frischem Nährmedium verdünnt.

Für die Versuche werden die Zellen in verschiedenen Dichten auf 24er-Platten ausgesät, z. T. auch in Kombination mit den BEAS-2B Zellen.

2.2.2 Co-Kultivierung

Zellen kommen im Organismus nie isoliert vor, sondern stehen immer in Kontakt mit anderen Zelltypen in ihrer Umgebung, wodurch es zu vielfältigen gegenseitigen Beeinflussungen kommt. Daher wurden auch Experimente zur Co-Kultivierung von BEAS-2B- und U937-Zellen durchgeführt. BEAS-2B-Zellen werden dazu auf 24er-Platten ausgesät und bis zur Konfluenz 2 bis 3 Tage bei 37 °C kultiviert. Anschließend wird der Überstand abgenommen und je 1 ml einer U937-Zellsuspension in LHC-Medium in die Wells gegeben. So werden die beiden Zelltypen 24 h gemeinsam kultiviert und stehen anschließend für Experimente zur Verfügung.

Eine andere Variante, die gegenseitige Beeinflussung der Zelltypen zu untersuchen, besteht in der Verwendung von Epithelzell-konditioniertem Medium (ECCM). Dazu werden die BEAS-2B-Zellen normal in 75 cm²-Flaschen kultiviert. Nach zwei Tagen wird der Überstand abgenommen und als Kulturmedium für U937-Zellen weiterverwendet. Diese werden also in konditioniertem Medium kultiviert, das bereits in Kontakt mit BEAS-2B-Zellen stand und somit Faktoren enthält, die von den Epithelzellen in die Umgebung abgegeben worden sind und möglicherweise die Differenzierung der Prämonozyten beeinflussen. Die Suspension von U937-Zellen in ECCM kann anschließend auf 24er-Platten ausgesät und für Experimente weiterverwendet werden.

2.3 Durchflusszytometrie zum Nachweis von CD14

Der Nachweis des CD14-Antigens auf BEAS-2B Zellen wurde mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS) durchgeführt. Bei diesem auch als Durchflusszytometrie bezeichneten Verfahren werden Zellen mit einem spezifischen Antikörper gegen dasjenige Protein markiert, das man nachweisen will, wobei der Antikörper an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Die eigentliche Messung beruht darauf, dass die markierten Zellen von einem Laserstrahl erfasst werden, wodurch es zu Lichtstreuung und einer Anregung der gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe kommt. Das von diesen emittierte Licht einer bestimmten Wellenlänge kann anschließend gemessen werden. Die Zellen werden dabei *einzel*n von dem Laserstrahl erfasst, so dass im Prinzip jede einzelne Zelle gezählt und charakterisiert werden kann. Daher wird das Ergebnis der FACS auch in *counts* angegeben.

Zunächst werden die Zellen, die entweder für 24 h mit 10 µg/ml LPS vorinkubiert oder unbehandelt waren, mit Trypsin/EDTA vom Flaschenboden gelöst, zentrifugiert und in einer Dichte von 600.000 Zellen/100 µl in BD FACFlow[®] resuspendiert. Zu der

Suspension werden jeweils 4 µl der Antikörperlösung bzw. der IgG-Isotypkontrolle gegeben. An den verwendeten CD-14-Antikörper war APC (Allophycocyanin) als Fluorophor gekoppelt. Nach 30-minütiger Inkubation im Kühlschrank gibt man 900 µl FACSFlow[®] zu, um die Reaktion zu stoppen. Die Suspension wird zentrifugiert, das Pellet in 300 µl FACSFlow[®] resuspendiert und mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur[®] von BD vermessen.

Chemikalien	
CD14-Antikörper, Klon 18D11, Isotyp IgG1	Immunotools, Friesoythe
Mouse-IgG Isotyp Control, APC-konjugiert	
BD FACSFlow [®] Sheath Fluid	BD Biosciences, Heidelberg

Geräte und Material	
FACSCalibur [®]	BD Biosciences, Heidelberg
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus Instruments, Hanau

2.4 Dot Blot zum Nachweis von CD14

Der Dot Blot eignet sich zum Nachweis eines bestimmten Zellproteins mit Hilfe einer Antikörperdetektion. Im Unterschied zum Western Blot erfolgt hier jedoch keine elektrophoretische Auftrennung des Proteingemisches, die der Größenbestimmung des gesuchten Proteins dient. Stattdessen wird das Zelllysate direkt auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen, mit Antikörper inkubiert und das Protein per Chemilumineszenz detektiert.

Zunächst werden die Zellen mehrmals mit je 5 ml kaltem PBS-Puffer pro Flasche gewaschen und anschließend unter Zusatz von jeweils 5 ml PBS zweimal mit einem Zellschaber abgeschabt. Die erhaltenen Zellsuspensionen werden vereinigt und 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird anschließend in 250 µl RIPA-Puffer pro geerntete Flasche aufgenommen und die Suspension 60 min auf Eis inkubiert, um die Zellen zu lysieren. Dem Puffer muss vorher ein Proteaseinhibitor zugesetzt werden; dazu löst man eine Tablette eines Inhibitor-Cocktails in 1 ml PBS und vermischt diese Lösung in einem Verhältnis von 1:10 mit RIPA-Puffer.

Um feste Zellbestandteile abzutrennen, wird das Lysat anschließend 10 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand stellt das fertige Zelllysat dar.

Dieses wird nun punktförmig auf eine Nitrocellulose-Membran aufgetragen und die Membran anschließend über Nacht unter Schütteln in PBST-Puffer (PBS-Puffer mit 0,6 % Tween) mit 5 % Magermilchpulver inkubiert, um überzählige Proteinbindungsstellen abzusättigen. Am nächsten Tag wird die Membran dreimal für 10 min in PBST gewaschen und 60 min mit dem ersten Antikörper (gegen CD14) inkubiert, welcher in einer Verdünnung von 1:250 in PBST mit 2 % Milchpulver verwendet wird. Nach dreimaligem Waschen in PBST für je 5 min wird die Membran ebenfalls für 60 min mit dem Sekundärantikörper in der Verdünnung 1:100.000 inkubiert. Dieser Antikörper richtet sich gegen Proteine der Spezies, aus der der erste Antikörper gewonnen wurde; in diesem Fall handelt es sich um einen anti-Kaninchen-Antikörper. Außerdem ist er an ein Enzym gekoppelt, die Meerrettichperoxidase (*horse radish peroxidase*, HRP), welches in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid die Spaltung von Luminol katalysiert und somit eine Lumineszenz hervorruft.

Nach erneutem dreimaligem Waschen zur Entfernung überschüssigen Sekundärantikörpers wird die Membran in der Dunkelkammer für eine Minute in ECL-Reagenz inkubiert. Dies besteht aus einer Luminol- und einer Wasserstoffperoxid-Lösung, die zuvor 1:1 gemischt werden. Anschließend legt man die Membran auf ein Trägerbrett, umwickelt dieses luftblasenfrei mit Frischhaltefolie und legt das Brett in eine Fotokassette, wobei ein Stück Röntgenfilm deckungsgleich mit der Membran in die Kassette gesteckt wird. Nach einer 20-minütigen Belichtungszeit wird der Röntgenfilm für eine Minute entwickelt, zum Stoppen der Reaktion eine Minute in Wasser getaucht und anschließend weitere 60 s fixiert. Die Schwärzung des Röntgenfilms zeigt eine Reaktion des Primärantikörpers mit dem gesuchten Protein an. Bei der Negativkontrolle wird die Membran lediglich mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Falls dieser unspezifisch an ein anderes Protein als den Primärantikörper binden würde, wäre auch in der Kontrolle eine Schwärzung sichtbar.

Chemikalien	
RIPA-Puffer	Sigma Aldrich, Steinheim
Anti-CD14-Antikörper (HPA002127)	
Anti-rabbit-IgG, Peroxidase-gekoppelt (A0545)	
Protease-Inhibitor Tabletten mini	Roche, Mannheim
Dulbecco's PBS	PAA, Cölbe
Tween 20	Fluka, Steinheim
Magermilchpulver	
Immobilon Western HRP Substrate	Millipore, Schwalbach
Entwickler (AGFA Rodinal)	Phototec, Norderstedt
Fixierer (Tetenal Superfix Plus)	

Geräte und Material	
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Little Chalfort, UK
Röntgenfilmkassette	Dr. Goos-Suprema, Heidelberg
Ultrazentrifuge L8-70M	Beckman Coulter, Krefeld

2.5 ELISA zur Messung von IL-8, RANTES und sCD14

Für die ELISAs werden die BEAS-2B Zellen auf 24er-Platten in einer Dichte von 100.000 Zellen pro Well ausgesät und 2-3 Tage wachsen gelassen. Anschließend werden die fraglichen Substanzen zugegeben und über Nacht inkubiert. Bei Versuchen mit spezifischen Antagonisten oder Antikörpern werden diese jeweils eine Stunde vor den Stimulantien (in den meisten Fällen Lipopolysaccharide) zugegeben. Die Zugabe der Ingwer-Extrakte erfolgt 30 min vor dem Hinzupipettieren der LPS-Lösung.

Am nächsten Tag werden die Überstände der Zellen abgenommen und entweder direkt verwendet oder für den späteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren.

Die Konzentration der jeweiligen Zytokine (Interleukin-8, RANTES, TNF α) wird mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) gemessen. Dabei werden fertige Kits von R&D-Systems verwendet und größtenteils den Anweisungen des Herstellers Folge geleistet. Lediglich die Konzentration der Antikörper und das Volumen der aufgetragenen Proben werden jeweils um die Hälfte niedriger gewählt als angegeben. Hierdurch können doppelt so viele Versuchsreihen wie vorgesehen mit einem Kit

durchgeführt werden, wobei die Sensitivität und die Reproduzierbarkeit erhalten bleiben.

Zur Untersuchung des Einflusses von Asymmetrischem Dimethylarginin auf die IL-8-Sekretion wird ein QuantiGlo®-ELISA-Kit verwendet, da dieser empfindlicher ist als die DuoSet®-Kits und schon Mengen ab 1 pg/ml detektieren kann. Das Messprinzip beruht hier auf der Detektion von Lumineszenz, daher wurden die Platten im Betacounter vermessen.

Lösliches CD14 im Zellüberstand wird mit Hilfe eines ELISA-Kits vom Typ Quantikine® gemessen, bei dem die 96-well-Platte bereits mit dem Detektionsantikörper vorimprägniert ist.

Chemikalien	
ELISA Duo Set® (IL-8, TNF α , RANTES)	R&D Systems, Wiesbaden
ELISA Quantikine® sCD14	
ELISA QuantiGlo® (IL-8)	
Substrate Reagent Pack	
Tris-HCl	AppliChem, Darmstadt
NaCl	J.T. Baker, Deventer, NL
Tween 20	Fluka, Buchs, Schweiz
2N H ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt
Dulbecco's PBS	PAA, Cölbe

Testsubstanzen	
Lipopolysaccharide von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 10	Sigma Aldrich, Steinheim
Lipopolysaccharide von <i>Escherichia coli</i> (O55:B5)	
PD 98059	
LY 294002	
SB 202190	
IRAK-1/4-Inhibitor I	
Retinsäure	
Ethylpyruvat	
Natriumpyruvat	
Tempol	
TNF α	

IFN γ	Sigma Aldrich, Steinheim
SB 225002	
Genistein	Enzo Life Sciences, Lörrach
SP 600125	
SN 50	Merck, Darmstadt
CD14-Antikörper, Klone 18D11 und MEM15	Immunotools, Friesoythe

Drogenmaterial (Ingwerextrakte und Bestandteile)	
Ingwer-Spissumextrakt UB 2005-141	Finzelberg, Andernach
Öliger Ingwer-Spezialextrakt, Ch.-B. 07023846	
Ätherisches Ingweröl	Gewonnen durch Wasserdampfdestillation (87)
Citral (cis/trans-Gemisch)	Sigma Aldrich, Steinheim
[6]-Gingerol	
ar-Curcumen	Gewonnen durch präparative HPLC aus Ätherischem Ingweröl (87)
α -Phellandren	Fluka, Buchs, Schweiz
β -Pinen	
[6]-Shogaol	Gewonnen durch präparative HPLC aus einem Ingwer-Hexanextrakt (91)

Geräte und Material	
Multiwellplatten 24er	Biochrom, Berlin
PolarStar® Galaxy Plate Reader	BMG, Offenburg
Clear Polystyrene Microplates 96 well	R&D Systems, Wiesbaden
ELISA Plate Sealers	
Betacounter Microbeta 1450	Perkin Elmer, Boston, USA

2.6 Proteome Profiler Array auf Zytokine und MAP-Kinasen

Der Proteome Profiler® Array der Firma R&D Systems dient dazu, mehrere verschiedene Proteine nebeneinander in Form eines Screenings zu detektieren. Zunächst lässt man die Zellen in einer Dichte von 500.000 Zellen in 5 ml auf 6-well-

Platten 3-4 Tage wachsen, wobei bei den entsprechenden Proben in den letzten 24 Stunden die jeweiligen Stimulantien zugesetzt werden. Anschließend werden die Zellen nach Vorschrift des Herstellers lysiert und zentrifugiert. Der Überstand wird bei -70 °C eingefroren oder direkt weiterverwendet. Zunächst bringt man das Lysat mit einer Nitrocellulose-Membran in Kontakt, auf die punktförmig Antikörper gegen die zu untersuchenden Proteine aufgetragen sind. Diese binden dann die in der Probe enthaltenen Proteine. Nach Zugabe eines zweiten Antikörpers und Streptavidin-HRP inkubiert man die Membran mit einem Chemilumineszenz-Reagenz als Substrat für die HRP und detektiert anschließend mit einem Röntgenfilm, wie im Kapitel „Dot Blot“ beschrieben. Die Intensität der entstehenden Punkte wird mit der GeneSoft® Analyse-Software densitometrisch ausgewertet. Vom Hersteller wird ein Koordinatensystem mitgeliefert, sodass die Punkte auf dem Röntgenfilm den entsprechenden Proteinen zugeordnet werden können.

Für diese Arbeit wurden zwei verschiedene Ausführungen des Arrays verwendet; ein Screening auf verschiedene Zytokine und Chemokine und eines auf die phosphorylierten, d. h. aktivierten Formen verschiedener MAP-Kinasen und anderer intrazellulärer Kinasen.

Chemikalien	
Proteome Profiler Human Phospho-MAPK Array Kit	R&D Systems, Wiesbaden
Proteome Profiler Human Cytokine Panel A Array Kit	
Immobilon Western HRP Substrate	Millipore, Schwalbach
Entwickler (AGFA Rodinal)	Phototec, Norderstedt
Fixierer (Tetena Superfix Plus)	
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Little Chalfont, UK

2.7 NFκB-Bestimmung an BEAS-2B-Zellen

Der TransAM® NFκB Kit (p65) der Firma ActiveMotif, Rixensart, Belgien, dient der Messung des p65-NFκB-Gehalts von Zellkernextrakten. Das Testprinzip beruht dabei auf einem ELISA. Im Gegensatz zu der bislang weit verbreiteten EMSA-Methode (*electrophoretic mobility shift assay*) stellt dieses Verfahren eine vergleichsweise zeitsparende und weniger aufwändige Methode dar.

2.7.1 Herstellung des Zellkernextraktes

BEAS-2B-Zellen werden in einer Dichte von 225.000 Zellen pro Flasche in 75 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät. Nach einem Mediumwechsel am dritten Tag nach der Aussaat werden am sechsten Tag die entsprechenden Testsubstanzen in frischem Medium zugefügt und 24 h inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit 10 ml eiskaltem PBS-Puffer unter Zusatz von 5 % Phosphatase-Inhibitor-Puffer (PBS/PIB) gewaschen. Nach Absaugen und erneuter Zugabe von 10 ml PBS/PIB werden die Zellen mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst; die Zellsuspension wird in ein vorgekühltes 15 ml-Röhrchen gefüllt und für fünf Minuten bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wird vorsichtig in 1 ml hypotonem Puffer resuspendiert, in ein gekühltes Eppendorfgefäß gegeben und 15 min auf Eis inkubiert, wobei die Zellen durch den osmotischen Druck anschwellen. Nach Zugabe von 50 µl einer 10 %igen Lösung von Nonidet P-40 wird das Gefäß für 10 s stark gevortext; dabei wird die Zellmembran lysiert, während die Kerne selbst intakt bleiben. Anschließend zentrifugiert man mit einer Tischzentrifuge (30 s bei 4 °C und 10.000 rpm); im Überstand befindet sich die zytoplasmatische Fraktion, die nicht mehr benötigt wird, das Pellet wird von den Zellkernen gebildet. Das Pellet wird nun in 50 µl Komplettlysepuffer aufgenommen und 30 min unter Schütteln auf Eis inkubiert, wodurch die Zellkerne lysiert werden. Anschließend wird für 10 min bei 14.000 g und 4 °C zentrifugiert; der Überstand ist der Kernextrakt, der nun bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert werden kann.

Chemikalien	
Phosphatase-Inhibitor-Puffer	Vorschriften siehe unten
Hypotoner Puffer	
Komplettlysepuffer aus TransAM® NFκB-Kit	ActiveMotif, Rixensart, Belgien
Nonidet P-40	Sigma Aldrich, Steinheim

Phosphatase-Inhibitor-Puffer		
Natriumfluorid	125 mM	Sigma Aldrich, Steinheim
β-Glycerophosphat	250 mM	
p-Nitrophenylphosphat (PNPP)	250 mM	
NaVO ₃	25 mM	

Hypotoner Puffer		
HEPES	20 mM	AppliChem, Darmstadt
Natriumfluorid	5 mM	Sigma Aldrich, Steinheim
Na ₂ MoO ₄	10 µM	
EDTA (Titriplex III)	100 µM	Merck, Darmstadt

2.7.2 NFκB-ELISA

Die NFκB-Bestimmung beruht auf dem ELISA-Prinzip, allerdings sind hier nicht wie bei den obigen Zytokin-ELISAs die entsprechenden Antikörper, sondern stattdessen ein Oligonucleotid auf einer 96-well-Platte immobilisiert, das die p65-NFκB-Konsensussequenz enthält (5'-GGGACTTCC-3'). An diese Sequenz bindet die aktivierte Form der p65-Untereinheit des NFκB, die in den Zellkernen enthalten ist.

Zunächst werden der Komplettlysepuffer, der Komplettbindungspuffer, der Waschpuffer und der Antikörperbindungspuffer nach den Vorschriften des TransAM® NFκB-Kits hergestellt. In jedes zu verwendende well werden 30 µl Komplettbindungspuffer gegeben. Anschließend fügt man in die Probenwells 20 µl verdünnte Probe (Zellkernextrakt wie unter 2.7.1 beschrieben) hinzu. Die Proben werden mit Komplettlysepuffer so verdünnt, dass sie jeweils 10 µg Protein enthalten. Der Proteingehalt wird zuvor mit einer Bradford-Bestimmung festgestellt. Als Positivkontrolle wird ein Kernextrakt von Jurkat-Zellen verwendet, der vom Hersteller mitgeliefert wird und ein starkes Signal geben soll.

Die weiteren Schritte entsprechen denen eines gewöhnlichen ELISAs – Bindung von primärem und HRP-gekoppeltem sekundärem Antikörper, Farbreaktion mit Tetramethylbenzidin und H₂O₂ sowie Messung der Absorption bei 450 nm – und sind vom Hersteller detailliert beschrieben.

2.8 [³H]-Thymidineinbau zur Messung der Zellproliferation

Zur indirekten Messung des Einflusses von LPS auf die Proliferation kann der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in die DNA herangezogen werden. Dazu werden BEAS-2B-Zellen in einer Dichte von 25.000 Zellen pro ml auf einer 24-well-Platte ausgesät und nach 24-stündigem Wachstum für weitere 48 h mit 0,1 µCi [³H]-Thymidin pro well sowie verschiedenen Konzentrationen von LPS inkubiert. Zur Untersuchung

der beteiligten Signalwege werden den Ansätzen spezifische Antagonisten verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden zugesetzt. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen für 10 min mit 1 ml kaltem MeOH pro well behandelt und getrocknet, um ihre Adhärenz zu verbessern. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS-Puffer erfolgt die Ausfällung der DNA durch Waschen mit je 1 ml eiskalter Trichloressigsäure (0,3 M) und anschließend die Lyse der Zellen mit 250 µl NaOH (0,3 M). Das Lysat wird mit jeweils 750 µl Szintillationslösung in eine 24er Softwell-Platte überführt, über Nacht geschüttelt und im Betacounter vermessen.

Chemikalien	
[³ H]-Thymidin	Perkin Elmer, Boston, USA
Szintillationslösung Unisafe 1	Zinsser Analytik, Frankfurt
NaOH 0,3 M	Waldeck, Münster
Trichloressigsäure 0,3 M	Merck, Darmstadt

Geräte und Material	
24er Softwell-Platte für MicroBeta 1450	Perkin Elmer, Boston, USA
24-well-Cassette für MicroBeta 1450	
Permanent Plateseal	
Betacounter Microbeta 1450	

2.9 HPLC zum Nachweis von Retinsäure und Vitamin D₃

Der Überstand von BEAS-2B-Zellen kann mittels HPLC auf Retinsäure und Vitamin D₃ untersucht werden, um zu überprüfen, ob eine dieser Substanzen für die veränderte Reaktion von U937-Zellen nach Kontakt mit dem Zellüberstand von BEAS-2B-Zellen verantwortlich sein könnte.

Als Proben wird LHC-9-Medium verwendet, welches 3 Tage auf BEAS-2B-Zellen gestanden hatte. Um sowohl Retinsäure als auch Vitamin D₃ simultan nachweisen zu können, wird eine Gradientenelution durchgeführt: Fließmittel A besteht aus Acetonitril und Wasser im Verhältnis 20:80 sowie 0,1 % TFA. Im Verlauf der Analyse wird der Anteil des Acetonitrils kontinuierlich erhöht, um auch das unpolare Vitamin D₃ zu erfassen. Zum Nachweis der beiden Substanzen werden die Proben mit den entsprechenden Standards gespikt.

Chemikalien	
Retinsäure-Standard	Sigma Aldrich, Steinheim
Vitamin D ₃ -Standard	
Acetonitril	
Trifluoressigsäure	Acros Organics, Nidderau
Fließmittel A: Acetonitril: Wasser 20:80; 0,1 % TFA	
Fließmittel B: Acetonitril, 0,1 % TFA	

Geräte und Material	
HPLC-Anlage D-7000	Merck-Hitachi , Darmstadt
HPLC-Pumpe L-7100	
UV-Detektor L-7400	
ACE C18-Säule, 100 x 2.1 mm, Partikelgröße 3 µm	Hichrom, Theale, UK

2.10 Messung der Zilienschlagfrequenz an Tracheaexplantaten

Diese Methode zur Bestimmung der ziliären Schlagfrequenz an Rattentracheaexplantaten wurde von Corinna Böckenholt im Arbeitskreis Verspohl etabliert.

Zur Gewinnung von Tracheaexplantaten werden Wistar-Ratten zunächst mit Ether getötet. Nach der Entfernung des umliegenden Fett- und Bindegewebes schneidet man die Trachea einschließlich des Kehlkopfes heraus, reinigt sie in auf 37 °C vorgewärmtem Puffer und schneidet in ca. 1 mm dicke Ringe. Um das Flimmerepithel nicht zu schädigen, wird die Trachea während der Präparation nur am Kehlkopf mit der Pinzette festgehalten. Anschließend werden die Ringe für 1-7 Tage im Brutschrank äquilibriert, da eine Messung der CBF noch am selben Tag nicht zu konstanten Messergebnissen führt. Das Medium wird nach jeweils drei Tagen gewechselt.

Nach Einbringen des Rings in eine auf 37 °C temperierte Kammer kann man den Zilienschlag des Präparates unter dem Mikroskop beobachten. Um ein Verrutschen des Organs zu vermeiden, wird der Ring mit einem Gitter fixiert. Die CBF wird mittels einer angeschlossenen Hochgeschwindigkeitskamera, die pro Sekunde 100 Bilder aufnehmen kann, und einer entsprechenden Software (LabView Vision Acquisition 8.5 in Verbindung mit SAVA 2.02 add on) gemessen.

Zur Stimulation werden einige Ringe für 24 Stunden mit je 10 ng/ml TNF α und LPS inkubiert. Anschließend wird das Präparat unter dem Mikroskop beobachtet und die CBF in einminütigem Abstand gemessen. Der Mittelwert der letzten fünf Messungen

vor Zugabe einer Substanz wird als 100 %-Wert verwendet. Nach der Zugabe wird 6 Minuten lang gemessen und der Mittelwert dieser 6 Werte als Messergebnis für diese Substanz festgehalten.

Chemikalien	
Immersionsöl	Leica, Wetzlar
LHC-9 Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's PBS	PAA, Cölbe
Diethylether	Merck, Darmstadt

Geräte und Material	
Inverses Mikroskop Eclipse Ti-U	Nikon, Düsseldorf
Heater Controller, Dual Channel	HSE Harvard Apparatus, March-Hugstetten
PM-4 Magnetic Chamber Platform	
Slow Flow Solution Heater	
Glas Coverslip 15 mm round	
Slice Hold-Down	
Silicone Grease Kit	
Kamera Basler A602f-2	Basler Vision Technologies, Ahrensburg
Basis-Software LabView Vision Acquisition 8.5	National Instruments Germany, München
Auswertungs-Software SAVA 2.02 add-on	Ammons Engineering, Mt. Morris, USA

2.11 Messung der Tracheakontraktion

Die Kontraktion des Trachealmuskels wird im Organbadversuch gemessen. Dazu werden gesunde Ratten beiderlei Geschlechts mittels Ethernarkose getötet, um ihnen anschließend die Trachea zu entnehmen. Das Organ wird von anhängendem Gewebe befreit und in Segmente aus drei zusammenhängenden Knorpelringen geschnitten. Diese werden mithilfe spezieller Organhaken in ein Organbad eingehängt, das auf 37 °C temperierte und mit Carbogen begaste Krebs-Henseleit-Lösung enthält. Einer der beiden Organhaken ist fixiert, der andere beweglich und mit einem Kraftaufnehmer verbunden. Wenn der Muskel kontrahiert, bewegt dieser Organhaken sich und die

Ausschläge werden nach einer Signalverstärkung von einer speziellen Software aufgezeichnet.

Nach dem Einhängen der Trachea in das Organbad schließt sich eine 60-minütige Äquilibrierungsphase an; währenddessen wird eine Vorspannung von 1 cN eingestellt und der Puffer alle 15 min gewechselt. In den letzten 15 min wird die Vorspannung auf 0,5 cN gesenkt. Die Substanzzugabe erfolgt erst dann, wenn die Spannung sich nicht mehr ändert.

Das hier eingesetzte Spasmogen Carbachol wirkt agonistisch an cholinergen Rezeptoren und ruft so eine Bronchokonstriktion hervor. Um eine Konzentrations-Wirkungskurve des Carbachols aufzuzeichnen, wird Carbachol dem Organ in aufsteigenden Konzentrationen (0,01 bis 10 μM) kumulativ zugesetzt. Die nächste Zugabe erfolgt immer erst dann, wenn mit der vorherigen Konzentration ein Plateau erreicht worden ist. ADMA bzw. L-Arginin wird jeweils 30 min vor der ersten Carbacholzugabe zugesetzt.

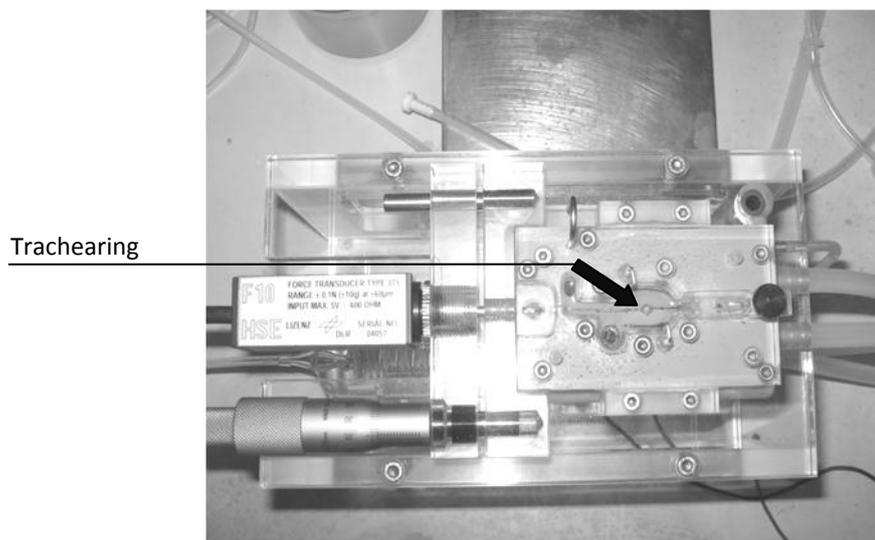


Abbildung 2.1: Aufsicht auf das Organbad

Chemikalien	
Krebs-Henseleit-Puffer	Zusammensetzung s.u.
Diethylether	Merck, Darmstadt
Carbachol (Carbamoylcholin)	Sigma Aldrich, Steinheim
Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA)	
L-Arginin	
SIN-1	

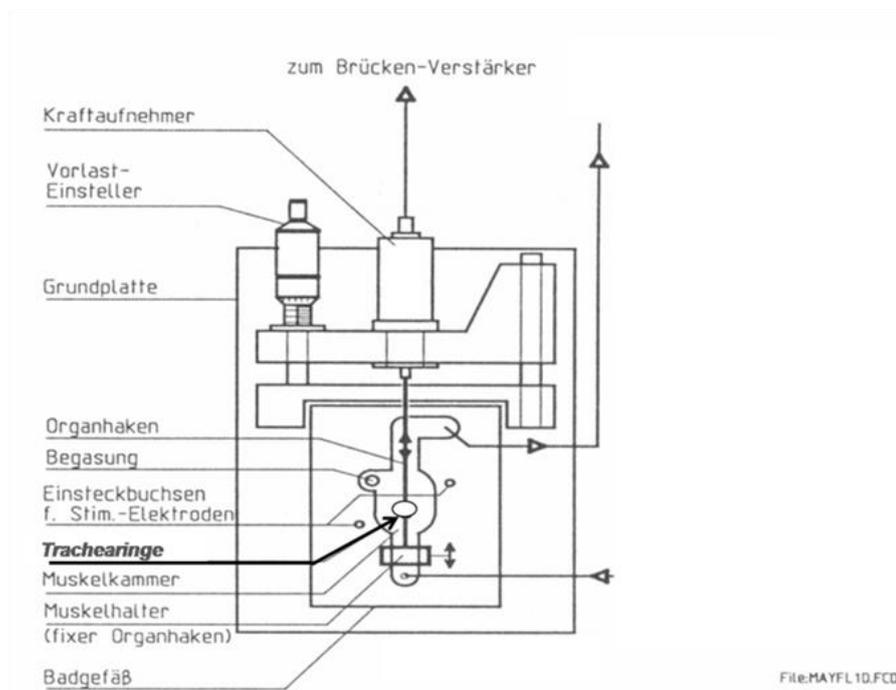


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Organbads

Krebs-Henseleit-Puffer		
NaHCO ₃	2,1 g	Merck, Darmstadt
Glucose	1,0 g	
KH ₂ PO ₄	0,1 g	
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,29 g	
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,37 g	
NaCl	6,9 g	J. T. Baker, Deventer, NL
KCl	0,35 g	Riedel de Häen, Seelze
gereinigtes Wasser	ad 1000 ml	

Geräte und Material	
Organbad Mayflower	HSE Harvard Apparatus, March-Hugstetten
Transducer F10, Typ 375, TAM-A	
Transducer Amplifier Module, Typ 705/1	
Thermostat Haake	Fisions, Berlin

2.12 Statistik und graphische Darstellung

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden als Mittelwert ± SEM (Standardfehler) angegeben. n beschreibt jeweils die Anzahl unabhängiger Versuche.

Für die statistische Auswertung wurden für den Vergleich von Einzelwerten ungepaarte t-Tests durchgeführt, nachdem die Normalverteilung der Werte festgestellt wurde. Der Vergleich ganzer Kurvenverläufe durch einen F-Test erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism, wobei einige Schritte manuell durchgeführt werden mussten; eine Anleitung hierzu findet sich unter http://www.graphpad.com/curvefit/1_model__2_datasets.htm. Ein p-Wert < 0,05 wurde jeweils als statistisch signifikant angesehen. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der Software SigmaPlot graphisch dargestellt.

3 Tiere

Die Tracheen für die Kontraktionsversuche und die Messung der Zilienschlagfrequenz stammten von weiblichen und männlichen Wistar-Ratten. Dies ist ein Stamm von Albino-Ratten, der 1906 im Wistar-Institut in Philadelphia, USA gezüchtet wurde. Bezogen wurden die Tiere über die Charles River Laboratories, Sulzfeld. Die Ratten erhielten freien Zugang zu Leitungswasser und Trockenfutter (Altromin® 1324, Fa. Altromin, Lage) und wurden in einem klimatisierten Raum bei durchschnittlich 22 °C und konstanter Luftfeuchtigkeit gehalten. Der Tag-Nacht-Zyklus betrug 12 Stunden. Zum Versuchszeitpunkt hatten die Tiere ein Gewicht von 180 bis 290 g. Alle Tierversuche wurden gemäß den geltenden Bestimmungen des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis von CD14

4.1.1 Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie kann unter Einsatz spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper die Anwesenheit gesuchter Oberflächenproteine nachgewiesen werden. Gezählt werden dabei Ereignisse, also einzelne Zellen, die am Laser vorbeiströmen und Fluoreszenzlicht ausstrahlen, d. h. das gesuchte Antigen aufweisen.

Nachdem man lange davon ausgegangen war, dass nur myeloide Zellen über einen membranständigen CD14-Rezeptor verfügen, wurde 2001 das Oberflächenantigen auf Darmepithel- und Gefäßendothelzellen nachgewiesen (37, 53). Über die Anwesenheit von CD14 auf Bronchialepithelzellen ist bisher nichts bekannt.

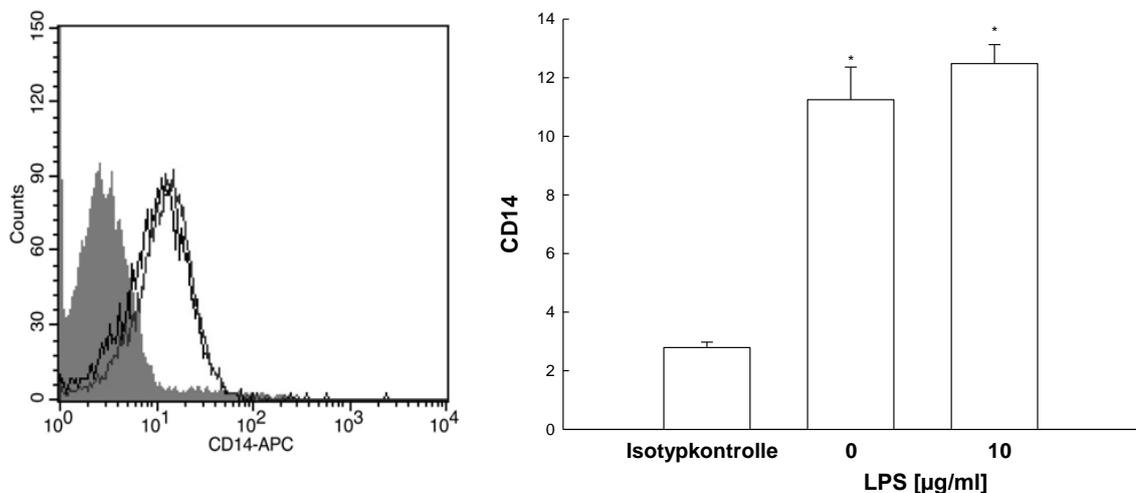


Abbildung 4.1: Die Anwesenheit von CD14 auf BEAS-2B-Zellen

Links: Das dunkel eingefärbte Feld stellt die IgG-Kontrolle dar. Die schwarze Linie repräsentiert die unbehandelten, die graue die mit 10 µg/ml LPS vorbehandelten Zellen. Rechts: Hier sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt. * $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle. Der Anstieg der mit LPS vorinkubierten gegenüber den unbehandelten Zellen ist nicht statistisch signifikant.

Abbildung 4.1 zeigt zunächst ein typisches Ergebnis der mehrmals wiederholten FACS-Analyse. Aus dem Diagramm geht hervor, dass CD14-Rezeptoren auf BEAS-2B-Zellen vorkommen. Deren Zahl erhöht sich durch eine vorherige Behandlung der Zellen mit 10 µg/ml LPS nur minimal und nicht statistisch signifikant. Rechts in der Abbildung ist eine Zusammenfassung der drei durchgeführten Versuche dargestellt.

4.1.2 Dot Blot

Um die Anwesenheit des CD14-Rezeptors auf BEAS-2B-Zellen zu bestätigen, wurde mit den lysierten Zellen ein Dot Blot durchgeführt. Bei der Negativkontrolle wurde die Membran identisch behandelt, lediglich der Primärantikörper wurde weggelassen. Dadurch konnte überprüft werden, ob der Sekundärantikörper unspezifisch gebunden wird.

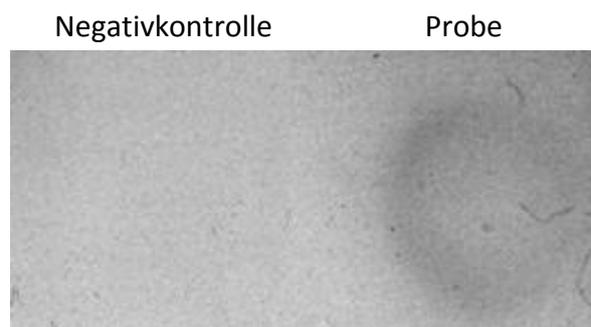


Abbildung 4.2: Dot Blot auf CD14 bei BEAS-2B-Zellen

Auf Abbildung 4.2 ist deutlich eine Schwarzfärbung erkennbar; an dieser Stelle war zuvor das Zelllysat aufgetragen worden. Im Bereich der Negativkontrolle ist kein Fleck zu sehen. Dies zeigt an, dass der spezifische CD14-Antikörper gebunden hat und also CD14 auf den untersuchten Zellen vorhanden ist. Somit konnte das Ergebnis der Durchflusszytometrie durch eine weitere Methode bestätigt werden.

4.1.3 ELISA

Neben der membranständigen Form existiert auch eine lösliche Variante von CD14; diese wird als sCD14 bezeichnet und kann von CD14-tragenden Zellen abgespalten und in die Umgebung abgegeben werden. So können auch Zellen, die kein membranständiges CD14 exprimieren, auf LPS reagieren.

Mit Hilfe eines ELISAs kann die Konzentration von sCD14 im Überstand von BEAS-2B-Zellen bestimmt werden. Aus Abbildung 4.3 geht hervor, dass die Konzentration in Abhängigkeit von der Inkubationszeit ansteigt. Als Kontrollwert wurde der sCD14-Gehalt des frischen LHC-9-Mediums bestimmt, der $100,8 \pm 11,6$ pg/ml beträgt; dieser Wert liegt allerdings unterhalb des niedrigsten Standards (250 pg/ml) der Kalibrierkurve. Nach 72-stündigem Kontakt des Mediums mit den Zellen stieg die Konzentration an löslichem CD14 auf $633,6 \pm 25,9$ pg/ml an. Mit 1 bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS konnte keine weitere Steigerung der sCD14-Sekretion erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

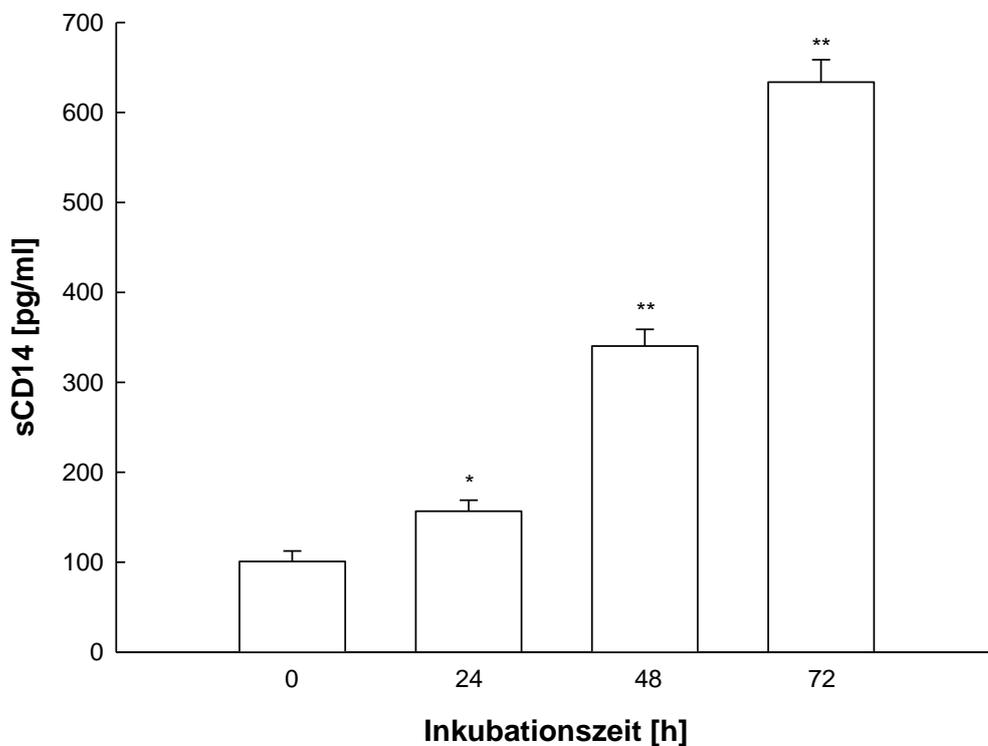


Abbildung 4.3: Zeitabhängigkeit der sCD14-Sekretion in den Überstand von BEAS-2B-Zellen
Nach unterschiedlichen Zeiten wurde der Überstand der Zellen abgenommen und der sCD14-Gehalt per ELISA bestimmt. $n = 3$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ gegen sCD14-Gehalt in frischem Medium, das nicht mit den Zellen in Kontakt war.

4.2 Einfluss von LPS auf die Proliferation von BEAS-2B-Zellen

Die bloße Anwesenheit des CD14-Rezeptors auf BEAS-2B-Zellen sagt noch nichts über die Funktionalität desselben aus. Um zu zeigen, dass die Zellen auf LPS auch tatsächlich reagieren, wurden diese in Anwesenheit von [³H]-Thymidin mit LPS stimuliert und dessen Auswirkungen auf die Zellproliferation gemessen. Dabei wird der Einbau von [³H]-Thymidin in die neugebildete DNA als Maß für die Zellproliferation herangezogen. Die Proliferation bronchialer Epithelzellen spielt eine wichtige Rolle beim Asthma-assoziierten Atemwegs-Remodelling.

Wie in Abbildung 4.4 dargestellt, führt eine 48-stündige Inkubation mit LPS zu einer verstärkten Proliferation der BEAS-2B-Zellen; ab einer Konzentration von 0,1 µg/ml ist der Anstieg statistisch signifikant. Bei 10 µg/ml LPS ist der Einbau von [³H]-Thymidin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mehr als verdoppelt ($204,8 \pm 36,7 \%$).

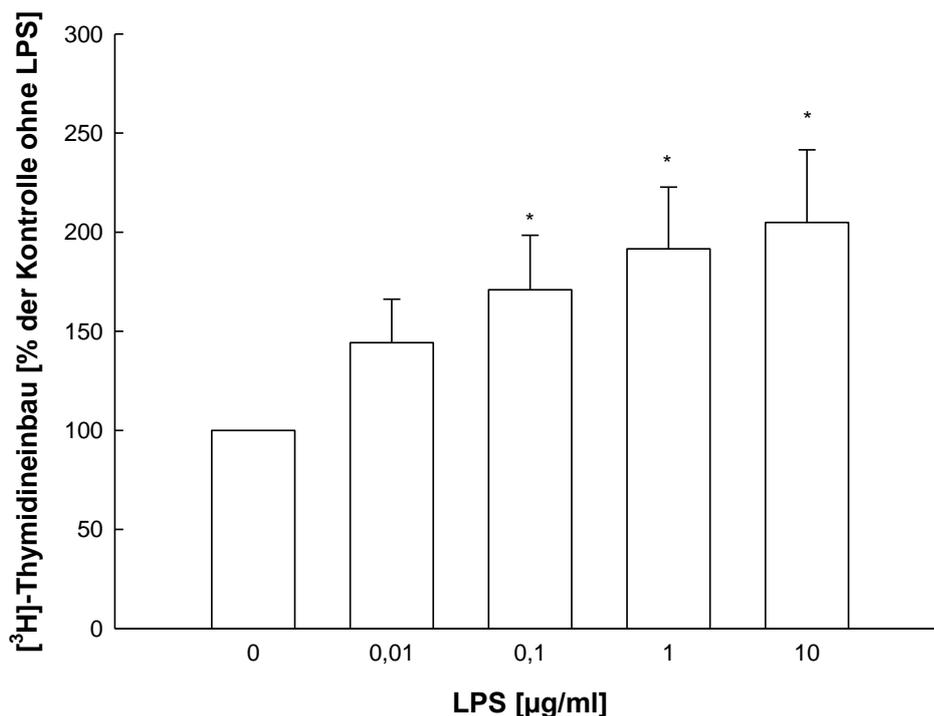


Abbildung 4.4: Einfluss der LPS-Stimulation auf die Proliferation von BEAS-2B-Zellen

Die Zunahme der Proliferation wurde über den Einbau von [³H]-markiertem Thymidin gemessen. Die Zellen wurden nach 24-stündigem Wachstum für weitere 48 h mit LPS in Anwesenheit von 0,1 µCi/well [³H]-Thymidin stimuliert; anschließend wurden die Zellen lysiert und die Radioaktivität im Betacounter vermessen. n = 3 (jeweils in Triplicates), * p < 0,05.

Um zu untersuchen, welche Signalwege an der LPS-induzierten Proliferation der BEAS-2B-Zellen beteiligt sind, wurden den Ansätzen 60 min vor der LPS-Zugabe spezifische Inhibitoren einiger intrazellulärer Kaskaden zugesetzt. Der p38-Inhibitor SB 202190, der JNK-Inhibitor SP 600125, der PI3-Kinase-Hemmer LY 294002 sowie der Tyrosinkinaseinhibitor Genistein führten zu einer Hemmung des [³H]-Thymidineinbaus nach Inkubation mit 0,1 bzw. 1 µg/ml LPS verglichen mit der Kontrolle, der nur LPS zugesetzt war. Statistisch signifikant sind die Unterschiede jedoch nur bei der höheren LPS-Konzentration.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die MAP-Kinasen p38 und JNK, die PI3-Kinase sowie Tyrosinkinasen an der LPS-induzierten Proliferationssteigerung in BEAS-2B-Zellen beteiligt sind. Der ebenfalls untersuchte ERK 1/2-Inhibitor PD 98059 zeigte keinen Effekt (Daten nicht gezeigt); die ERK 1/2 scheint also bei diesem Signalweg keine Rolle zu spielen.

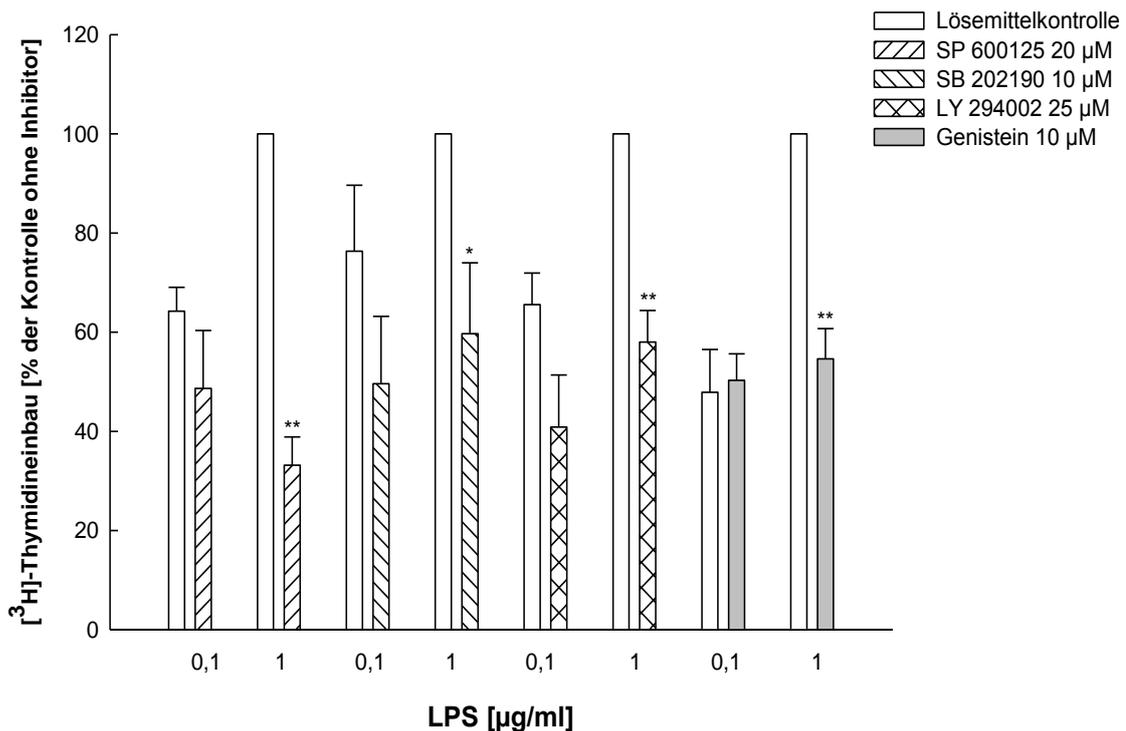


Abbildung 4.5: Einfluss spezifischer Inhibitoren auf die LPS-induzierte Proliferation

Die BEAS-2B-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von SP 600125, SB 202190, LY 294002 bzw. Genistein für 48 h mit 0,1 bzw. 1 µg/ml LPS stimuliert und anschließend die Proliferation mittels eines [³H]-Thymidin-Assays gemessen. Als Lösemittelkontrolle wurden 0,1 % DMSO (für SP 600125 und LY 294002), 0,01 % DMSO (für SB 202190) bzw. 0,1 % Ethanol (für Genistein) eingesetzt. Der Wert bei der höheren Konzentration ohne Zusatz des Inhibitors wurde jeweils gleich 100 % gesetzt. n = 3 (jeweils in Triplicates), * p < 0,05, ** p < 0,01.

4.3 Einfluss von Genistein auf die Proliferation von BEAS-2B-Zellen

Aus Abbildung 4.5 geht hervor, dass Genistein in einer Konzentration von 10 μM die durch 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS induzierte Steigerung der Proliferation von BEAS-2B-Zellen auf unter 60 % reduziert. Die Arbeit von Chen *et al.* führte zu der Frage, ob der Tyrosinkinaseinhibitor Genistein auch an unstimulierten Zellen Einfluss auf die Proliferation hat. Die Autoren hatten die Auswirkungen von Genistein auf das Wachstum der humanen Intestinalzelllinie Caco-2BBE untersucht (156).

Nach 24-stündigem Wachstum wurden die BEAS-2B-Zellen für weitere 48 h mit verschiedenen Genisteinkonzentrationen sowie 0,1 μCi [^3H]-Thymidin inkubiert, wie im Methodenteil beschrieben. Abbildung 4.6 verdeutlicht, dass abhängig von der eingesetzten Konzentration unterschiedliche Effekte auftreten: Die niedrigste Konzentration (1 μM) führt zu einer verstärkten Proliferation, während 100 μM Genistein die Proliferation hemmt. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Chen *et al.*, die ebenfalls eine je nach Konzentration entgegengesetzte Wirkung feststellten.

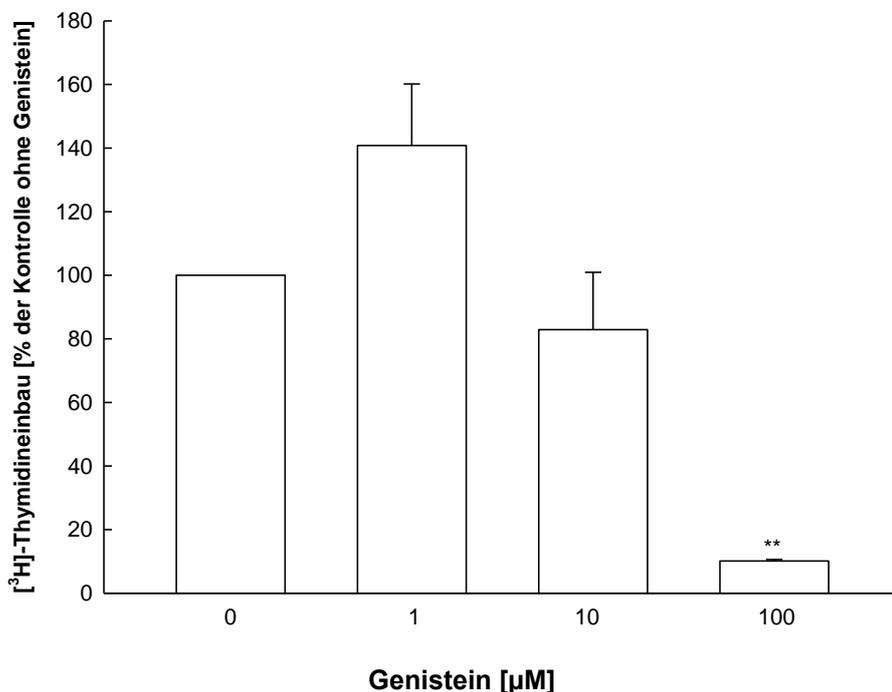


Abbildung 4.6: Einfluss von Genistein auf die Proliferation von BEAS-2B-Zellen

Die Zellen wurden für 48 h mit verschiedenen Genistein-Konzentrationen inkubiert; anschließend wurde die Proliferation mittels eines [^3H]-Thymidin-Assays gemessen. Der Wert ohne Zusatz von Genistein wurde gleich 100 % gesetzt. $n = 3$ (jeweils in Triplicates), ** $p < 0,01$.

4.4 Proteome Profiler® Array für MAP-Kinasen

Mit Hilfe des Proteome Profiler® Arrays kann die relative Aktivität der phosphorylierten Form verschiedener intrazellulärer Kinasen semiquantitativ bestimmt werden. Durch dieses Screening sollte ermittelt werden, welche Kinasen in BEAS-2B-Zellen durch Inkubation mit LPS heraufreguliert werden. Dadurch ergeben sich Hinweise, welche spezifischen Inhibitoren im IL-8-ELISA eingesetzt werden könnten: Wenn eine bestimmte Kinase durch LPS nicht beeinflusst wird, wird auch ihre Hemmung vermutlich keine Auswirkung auf die LPS-induzierte IL-8-Sekretion haben.

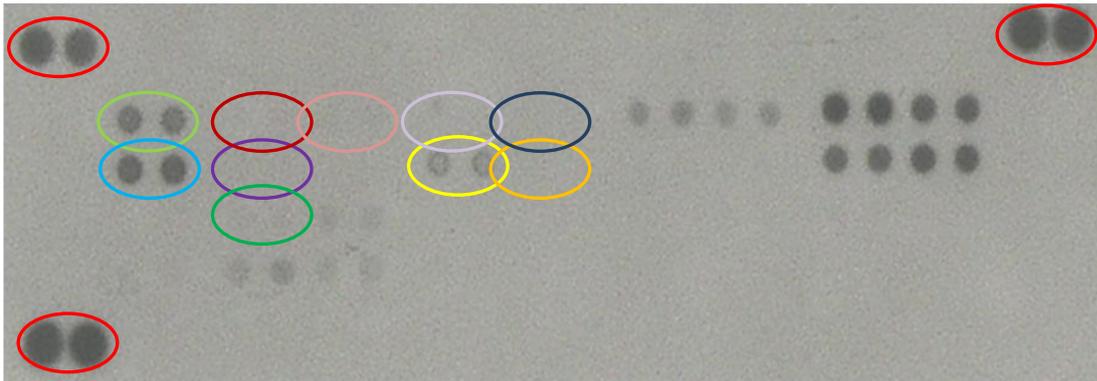
Aus Abbildung 4.7 geht hervor, dass eine Stimulation der BEAS-2B-Zellen mit 10 µg/ml Lipopolysacchariden zu einer Heraufregulierung verschiedener Kinasen führt. Je dunkler ein Fleck im Vergleich zu dem entsprechenden Punkt der Negativkontrolle ist, desto stärker wurde die jeweilige Kinase phosphoryliert.

Für eine gesicherte Aussage muss jedoch noch eine densitometrische Auswertung erfolgen. Dabei wird die Dichte der Flecken jeweils auf den Mittelwert der drei doppelten Kontrollen in der linken und rechten oberen sowie der linken unteren Ecke bezogen. Auch diese sind in der Negativkontrolle schwächer ausgeprägt, ihre Intensität wurde daher gleich 100 % gesetzt.

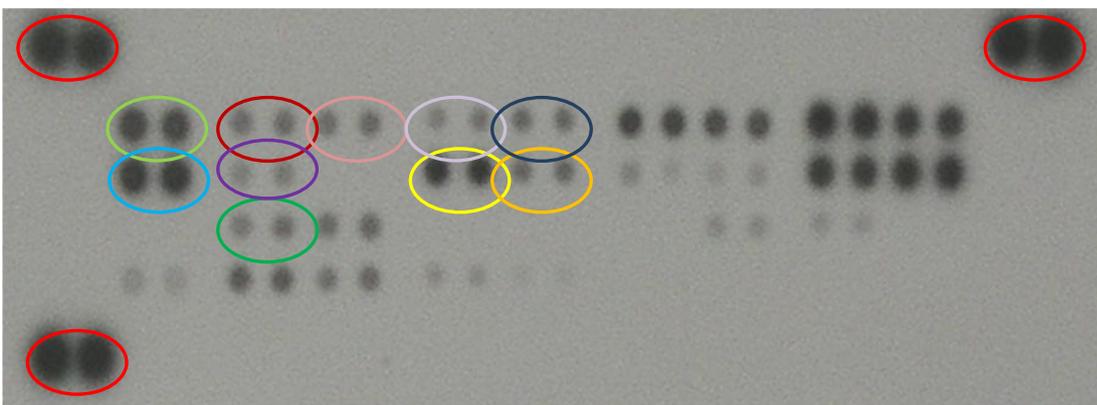
Abbildung 4.8 zeigt das Ergebnis der densitometrischen Auswertung. Alle untersuchten MAP-Kinasen, v. a. jedoch die p38-MAPK, werden durch eine Inkubation mit LPS in ihrer Aktivität gesteigert. Neben den MAPK wurden noch andere Kinasen, z. B. Akt 1-3 und RSK 1 und 2 untersucht. Hier wurde kein Unterschied zur Negativkontrolle festgestellt.

Da also Lipopolysaccharide in BEAS-2B-Zellen eine Heraufregulierung von MAPK bewirken, erscheint es möglich, dass eine Hemmung dieser Kinasen durch spezifische Inhibitoren zu einer Verminderung des biologischen Effekts einer LPS-Inkubation führt. Das Ergebnis lässt aber zunächst noch keine Aussage darüber zu, ob die betreffenden Kinasen auch an dem Signalweg beteiligt sind, der zur Ausschüttung von IL-8 nach Inkubation mit LPS führt.

Unstimulierte Zellen



10 µg/ml LPS für 24 h



- | | | | | | |
|---|-------------------|---|---------|--|-------|
|  | Positivkontrollen |  | JNK 2 |  | p38δ |
|  | ERK 1 |  | JNK pan |  | p38β |
|  | ERK 2 |  | p38γ |  | JNK 3 |
|  | JNK 1 |  | p38α | | |

Abbildung 4.7: Die Aktivierung intrazellulärer Kinasen durch LPS

Die Zellen wurden für 24 h mit 10 µg/ml LPS inkubiert und anschließend lysiert. Das Lysat wurde auf eine Membran aufgebracht, auf der punktförmig Antikörper gegen die phosphorylierte Form verschiedener MAPK aufgetragen waren. Die Auswertung des Screenings erfolgt mit einem vom Hersteller mitgelieferten Schema.

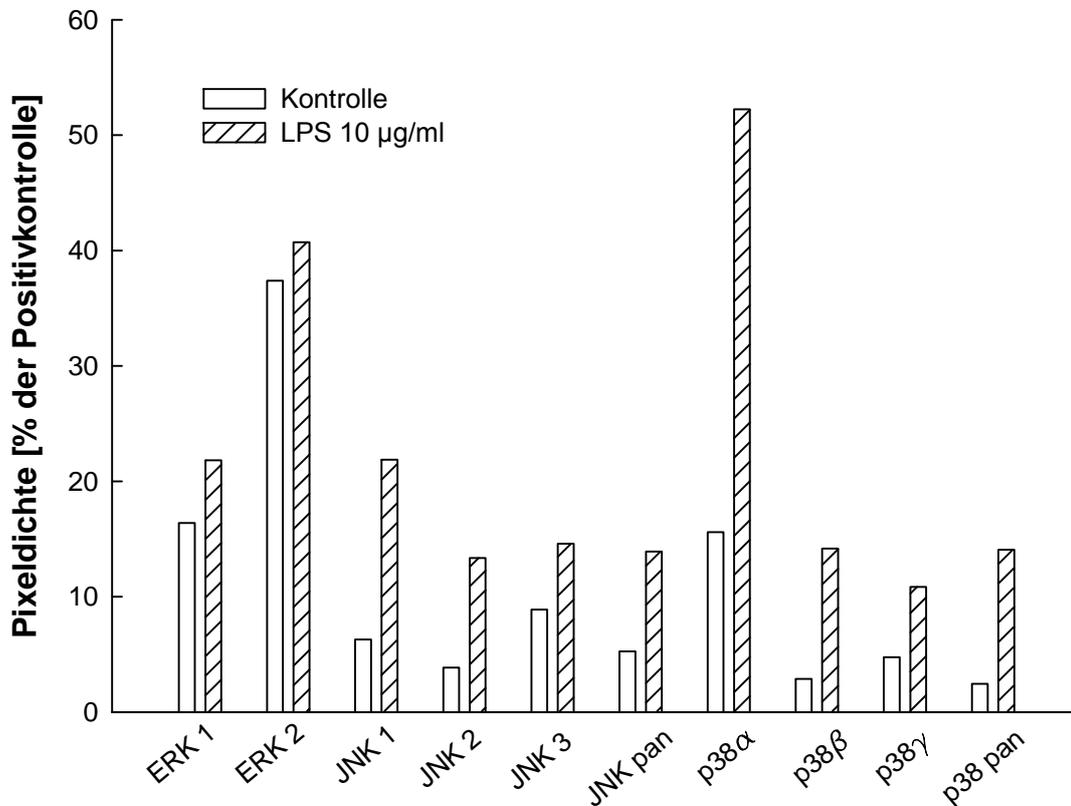


Abbildung 4.8: Densitometrische Auswertung des Proteome Profiler® Arrays

Mit Hilfe eines Densitometers und einer Analyse-Software (GeneSoft®) wurde die optische Dichte der schwarzen Flecken aus Abb. 4.7 und damit die relative Konzentration der jeweiligen MAPK ermittelt.

4.5 Aktivierung von NFκB

Der Transkriptionsfaktor NFκB fördert nach seiner Aktivierung und Translokation in den Zellkern die Expression zahlreicher proinflammatorischer Zytokine und weiterer Entzündungsmediatoren. Ob NFκB an BEAS-2B-Zellen durch Stimulation mit LPS heraufreguliert wird, ist bisher nicht bekannt.

Wie aus Abbildung 4.9 hervorgeht, führt die 24-stündige Inkubation mit LPS von *P. aeruginosa* in Konzentrationen von 1 und 10 µg/ml zu einem signifikanten Anstieg des NFκB-Gehalts im Kernextrakt. Nach sechs Stunden ist eine Zunahme zwar tendenziell zu erkennen, aber nicht statistisch signifikant.

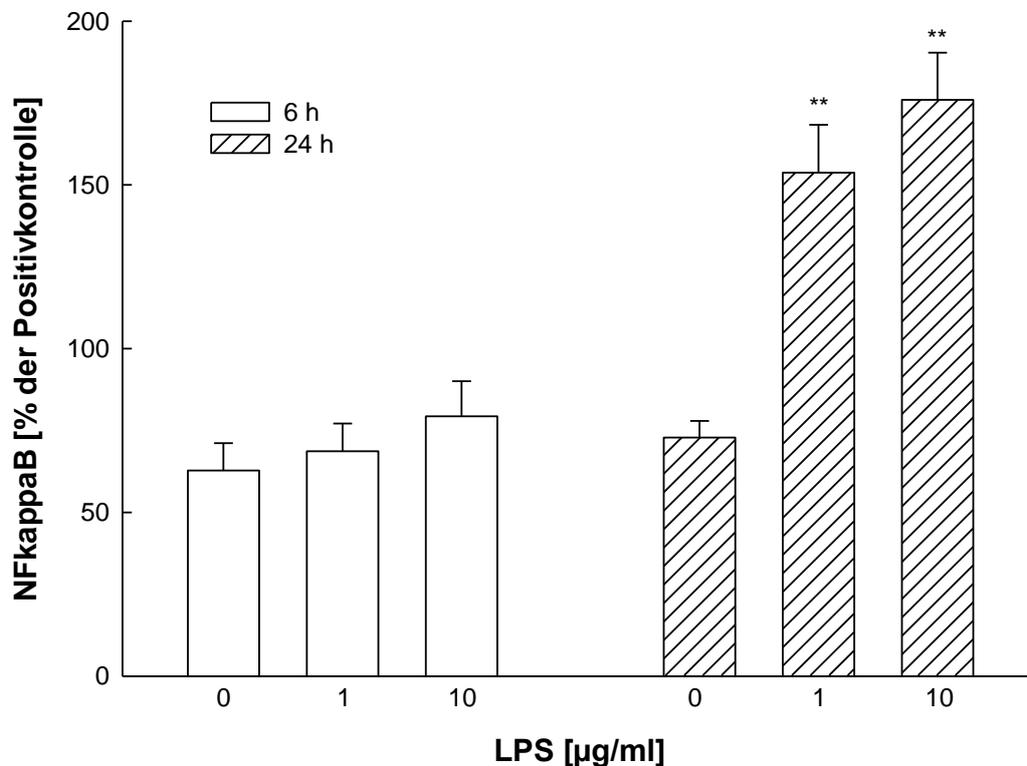


Abbildung 4.9: Einfluss von LPS auf die Aktivierung von NFκB

BEAS-2B-Zellen wurden für 6 bzw. 24 h mit 1 bzw. 10 µg/ml LPS von *P. aeruginosa* stimuliert. Anschließend wurden Kernextrakte hergestellt und deren NFκB-Gehalt mittels ELISA gemessen. Als Positivkontrolle diente ein vom Hersteller mitgelieferter Kernextrakt aus Jurkat-Zellen. n = 4 (jeweils in Duplicates), ** p < 0,01.

Soweit nicht anders angegeben, wurde für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche LPS von *Pseudomonas aeruginosa*, Serotyp 10, verwendet. Da die Lipopolysaccharide verschiedener Spezies jedoch durchaus unterschiedliche Eigenschaften haben können, wurden LPS von *P. aeruginosa* mit denen von *E. coli* (055:B5) im Hinblick auf ihre NFκB-stimulierende Aktivität verglichen.

Abbildung 4.10 zeigt, dass 10 ng/ml *E. coli*-LPS im Gegensatz zur gleichen Konzentration *P. aeruginosa*-LPS bereits einen starken Anstieg der NFκB-Aktivität bewirkt; es besteht also ein deutlicher Unterschied in der Wirkstärke der beiden LPS-Arten.

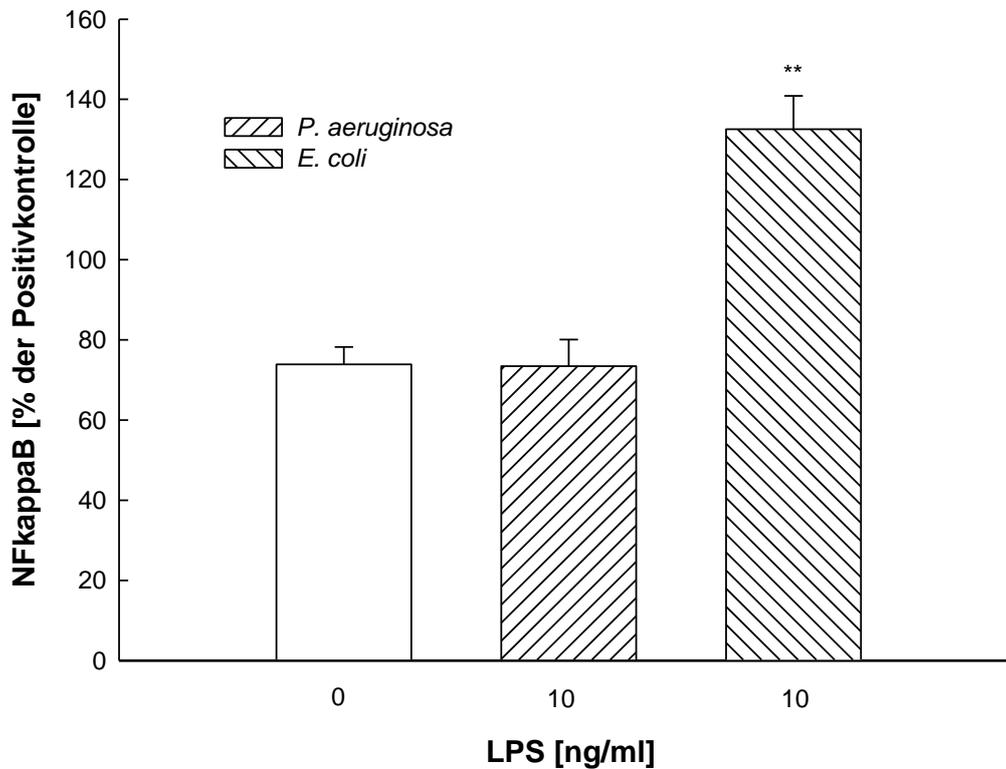


Abbildung 4.10: Vergleich der NFκB-Aktivierung durch LPS von *P. aeruginosa* und *E. coli*

BEAS-2B-Zellen wurden für 24 h mit je 10 ng/ml LPS von *P. aeruginosa* bzw. *E. coli* inkubiert. Anschließend wurden Kernextrakte hergestellt und deren NFκB-Gehalt mittels ELISA gemessen. Als Positivkontrolle diente ein vom Hersteller mitgelieferter Kernextrakt aus Jurkat-Zellen. n = 4 (jeweils in Duplicates), ** p < 0,01 gegen die unstimulierte Kontrolle sowie gegen 10 ng/ml LPS von *P. aeruginosa*.

4.6 Stimulation der Zytokinsekretion durch LPS

Um nachzuweisen, dass BEAS-2B-Zellen auf LPS nicht nur mit vermehrter Proliferation und Heraufregulierung von MAPK, sondern auch mit der Ausschüttung von Zytokinen reagieren, wurden sie für verschiedene Zeiträume mit LPS unterschiedlicher Konzentrationen inkubiert; die Sekretion der Zytokine Interleukin-8 und RANTES wurde anschließend per ELISA gemessen.

Für IL-8 zeigt sich eine deutliche Steigerung der Sekretion, die sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig ist. 10 µg/ml LPS haben einen ähnlichen Effekt wie die als Positivkontrolle eingesetzten Zytokine TNFα und IFNγ in einer Konzentration von jeweils 5 ng/ml: Beide Stimulationen bewirken nach 48 h einen IL-8-Anstieg auf über 5000 pg/ml. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.11 dargestellt.

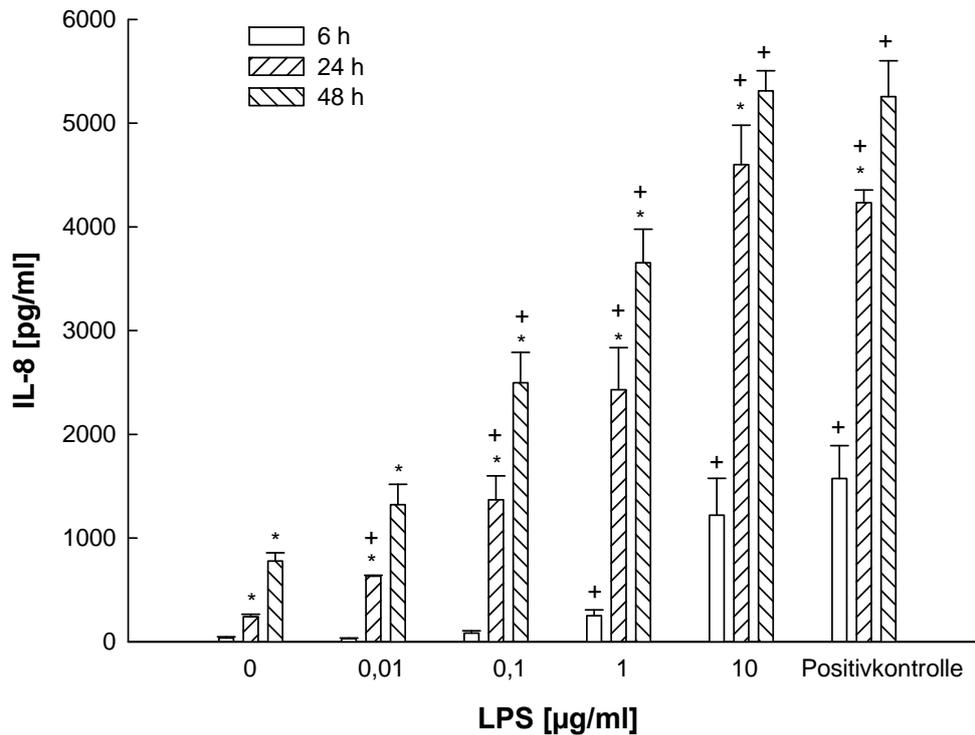


Abbildung 4.11: Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Interleukin-8-Sekretion nach Stimulation mit LPS

Als Positivkontrolle diente ein Zytokin-Mix aus je 5 ng/ml TNF α und IFN γ . Die Messung der IL-8-Konzentration erfolgte mittels ELISA. n = 3, * p < 0,05 gegen dieselbe Konzentration zum jeweils kürzeren Zeitpunkt, + p < 0,05 gegen die Negativkontrolle zum selben Zeitpunkt.

Bei der Messung des proinflammatorischen Zytokins RANTES zeigte sich ein wesentlich geringerer LPS-Effekt als bei IL-8 (Abb. 4.12). Während die Positivkontrolle zu einer RANTES-Konzentration von 648 ± 26 pg/ml führte, konnte mit der höchsten eingesetzten LPS-Konzentration von 10 µg/ml nur ein Anstieg auf 71 ± 2 pg/ml erreicht werden. Dennoch ist auch dieser geringe Anstieg statistisch signifikant gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Die Inkubation mit LPS erfolgte hier über 24 h, Versuche zur Zeitabhängigkeit der RANTES-Freisetzung wurden auf Grund der niedrigen Werte nicht durchgeführt.

Als drittes Zytokin wurde TNF α im Überstand der mit LPS inkubierten BEAS-2B-Zellen gemessen. Allerdings konnte hier auch mit 10 µg/ml LPS keine messbare TNF α -Sekretion beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Um zu überprüfen, ob die Zellen überhaupt zur TNF α -Produktion angeregt werden können, wurden sie mit verschiedenen anderen Stimuli (IFN γ , Interleukin-1 β) behandelt; in keinem Fall konnte jedoch ein Effekt erzielt werden.

Die unterschiedlichen Auswirkungen der LPS-Stimulation auf die Sekretion von Interleukin-8, RANTES und TNF α lassen darauf schließen, dass die einzelnen Zytokine über verschiedene Signalwege heraufreguliert werden.

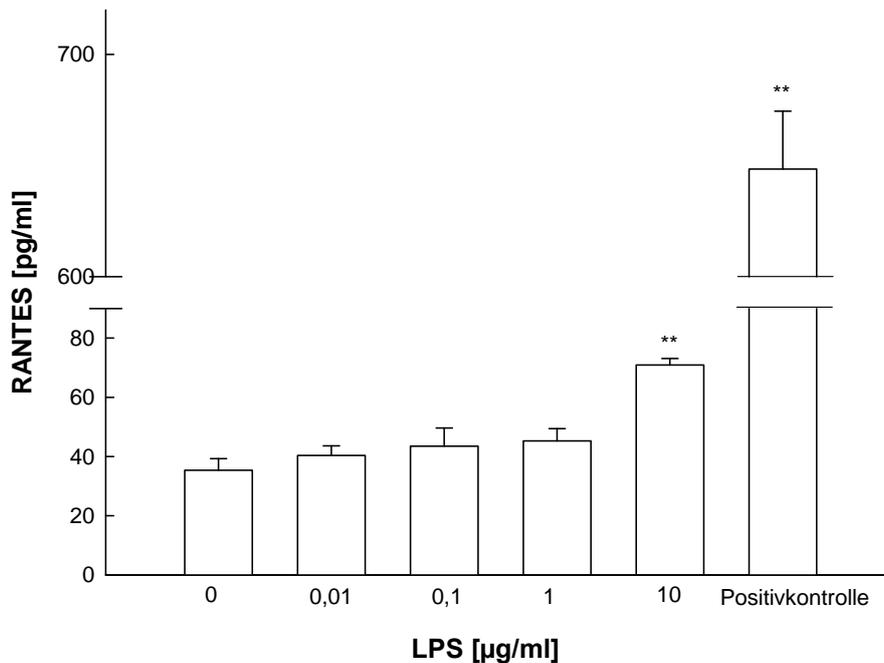


Abbildung 4.12: Auswirkung von LPS auf die RANTES-Freisetzung in BEAS-2B-Zellen

Nach drei Tagen Wachstum wurden die Zellen für 24 h mit den angegebenen LPS-Konzentrationen inkubiert. Als Positivkontrolle dienten je 5 ng/ml TNF α und IFN γ . Die RANTES-Messung erfolgte mit ELISA. n = 3, ** p < 0,01 gegen die Negativkontrolle.

4.6.1 Vergleich verschiedener Lipopolysaccharide

Wie bei der NF κ B-Aktivierung wurden auch für die IL-8-Sekretion Vergleichsversuche zwischen LPS von *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die BEAS-2B-Zellen schon auf wesentlich geringere Konzentrationen von *E. coli*-LPS mit IL-8-Ausschüttung reagieren, als dies bei *P. aeruginosa*-LPS der Fall ist. Bereits eine LPS-Konzentration von 0,01 µg/ml führt bei *E. coli* zu höheren Werten als 10 µg/ml *P. aeruginosa*-LPS (siehe Abb. 4.13).

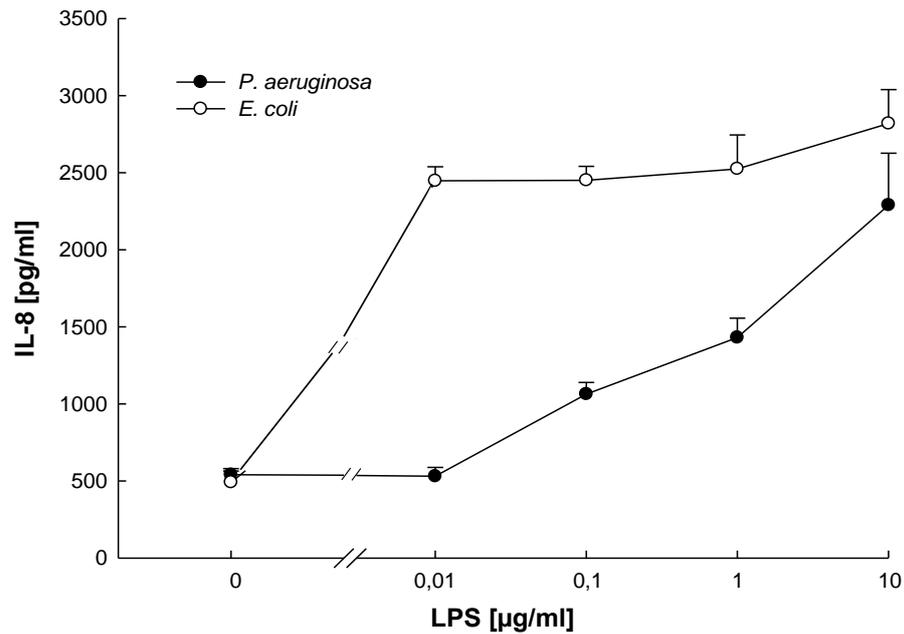


Abbildung 4.13: Vergleich des Effektes von LPS verschiedener Spezies auf die IL-8-Sekretion
Die BEAS-2B-Zellen wurden für 24 h mit LPS inkubiert. Die Messung des IL-8 erfolgte mit ELISA. $n = 3$. Die Kurvenverläufe sind statistisch signifikant voneinander verschieden ($p < 0,01$).

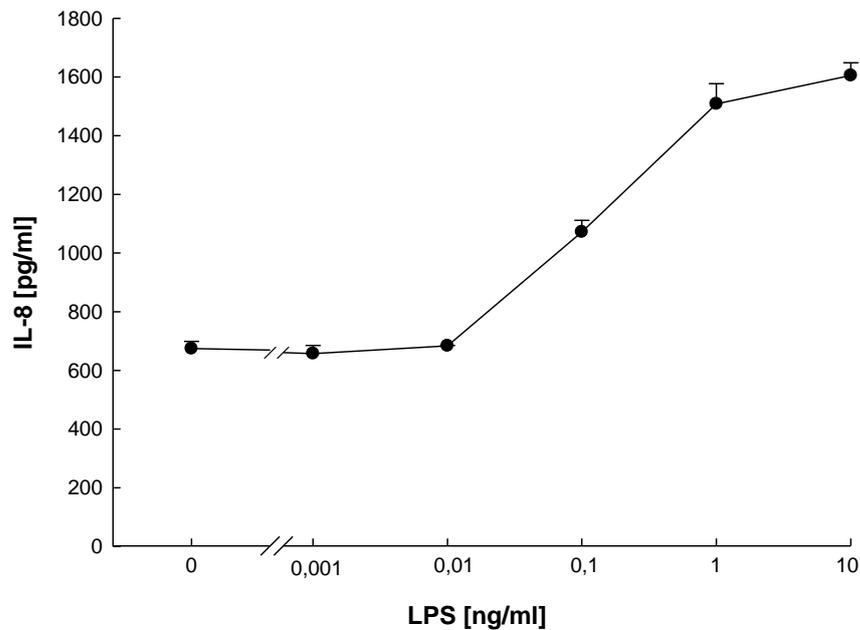


Abbildung 4.14: Dosis-Wirkungskurve von *E. coli*-LPS in Bezug auf die IL-8-Sekretion
Die BEAS-2B-Zellen wurden für 24 h mit LPS von *E. coli* inkubiert; anschließend wurde der IL-8-Gehalt im Überstand per ELISA vermessen. $n = 3$.

In diesem Konzentrationsbereich zeigt sich für das *E. coli*-LPS keine typische Dosis-Wirkungskurve. Daher wurde eine neue Kurve mit Konzentrationen aufgenommen, bei denen das *P. aeruginosa*-LPS noch keine Wirkung zeigt. Aus Abbildung 4.14 geht hervor, dass die Dosis-Wirkungskurve von *E. coli*-LPS im Vergleich zum LPS von *P. aeruginosa* (Abb. 4.13) um ca. eine Größenordnung nach links verschoben ist.

4.6.2 Funktionalität des CD14-Rezeptors

Die Reaktion der BEAS-2B-Zellen auf LPS ist ein Hinweis darauf, dass der gefundene CD14-Rezeptor nicht nur vorhanden ist, sondern auch eine Funktion erfüllt. Allerdings könnte die LPS-Aktivierung auch noch über andere Wege verlaufen, die nicht von CD14 abhängen. Um eine Beteiligung von CD14 an der LPS-induzierten IL-8-Ausschüttung abzusichern, wurde den Zellen eine Stunde vor Zugabe des LPS ein spezifischer monoklonaler CD14-Antikörper des Subtyps 18D11 zugesetzt. Im Falle einer Abnahme der IL-8-Sekretion könnte man auf eine Beteiligung von CD14 am Signalweg schließen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.15 dargestellt.

Zwar unterscheiden sich die Kurvenverläufe in An- bzw. Abwesenheit des Antikörpers nicht signifikant voneinander, allerdings zeigt sich v. a. bei einer LPS-Konzentration von 1 µg/ml ein deutlicher Hemmeffekt. Der Vergleich der beiden Einzelwerte bei dieser Konzentration ergibt einen p-Wert von 0,003 ($1204,3 \pm 82,5$ vs. $655,9 \pm 68,7$ pg/ml). Die Kurve ist nach rechts verschoben.

Da also die Anwesenheit eines Antikörpers eine verminderte IL-8-Sekretion zur Folge hat, kann man davon ausgehen, dass CD14 an der LPS-vermittelten Ausschüttung von IL-8 zumindest mitbeteiligt ist.

Es existieren verschiedene Subtypen monoklonaler Antikörper gegen CD14. Der hier verwendete 18D11-Klon wurde auch in der FACS-Analyse eingesetzt. Daneben wurde der geschilderte Versuch auch mit dem Klon MEM15 durchgeführt; hier zeigten sich jedoch in den verwendeten Konzentrationen von 2 und 10 µg/ml keine messbaren Effekte. Die Wahl des richtigen Antikörpers scheint also großen Einfluss auf das Ergebnis zu haben (37).

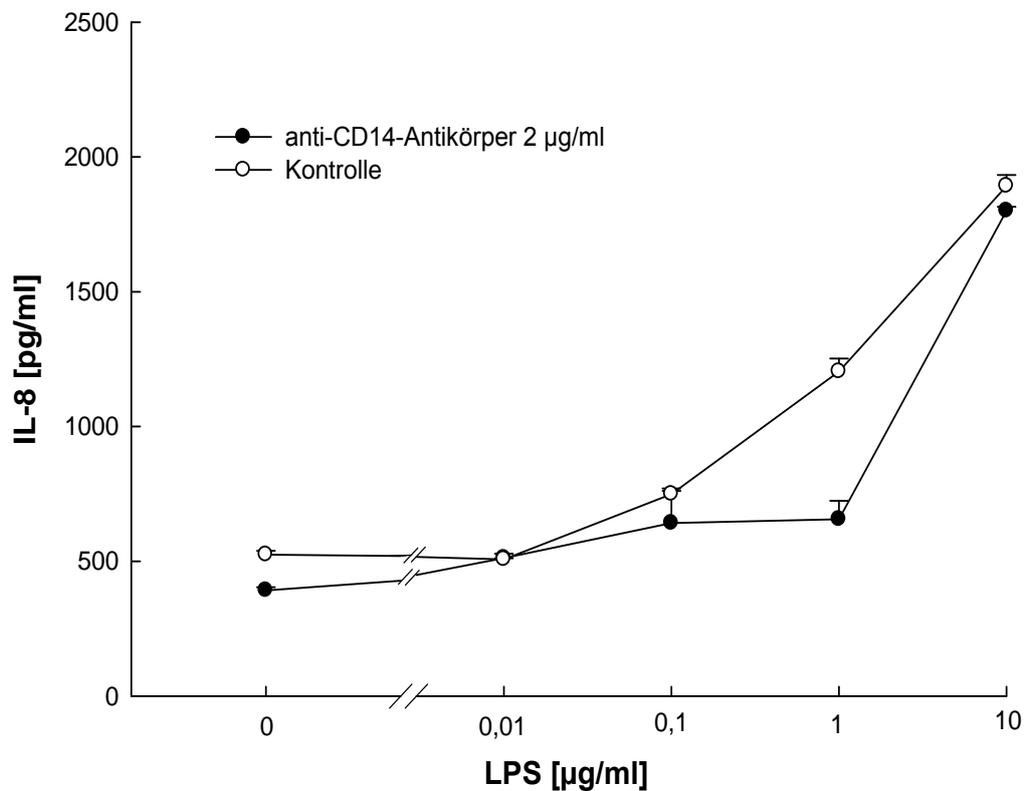


Abbildung 4.15: Einfluss des CD14-Antikörpers 18D11 auf die LPS-induzierte IL-8-Sekretion

Die BEAS-2B-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von 2 µg/ml des CD14-Antikörper-Subtyps 18D11 für 24 h mit LPS inkubiert. Die Messung des IL-8 erfolgte mit ELISA. n = 3. Die Kurvenverläufe sind nicht statistisch signifikant verschieden, es besteht nur eine tendenzielle LPS-Hemmung durch den Antikörper.

4.6.3 Die Beteiligung intrazellulärer Kinasen am untersuchten Signalweg

4.6.3.1 MAP-Kinasen

Ob die IL-8-Ausschüttung der BEAS-2B-Zellen nach LPS-Aktivierung über MAP-Kinasen verläuft, ist aus der Hochregulierung der MAPK im Proteome Profiler® noch nicht zu schließen. Zwar weiß man nun, dass eine LPS-Inkubation einerseits zur IL-8-Sekretion und andererseits zur Phosphorylierung von MAPK führt, über den Kausalzusammenhang sagt das jedoch nichts aus.

In den nachfolgenden Versuchen wurden per ELISA IL-8-Konzentrationen nach LPS-Inkubation gemessen, allerdings unter Zusatz spezifischer Inhibitoren für den ERK 1/2-, den p38- und den JNK-Weg.

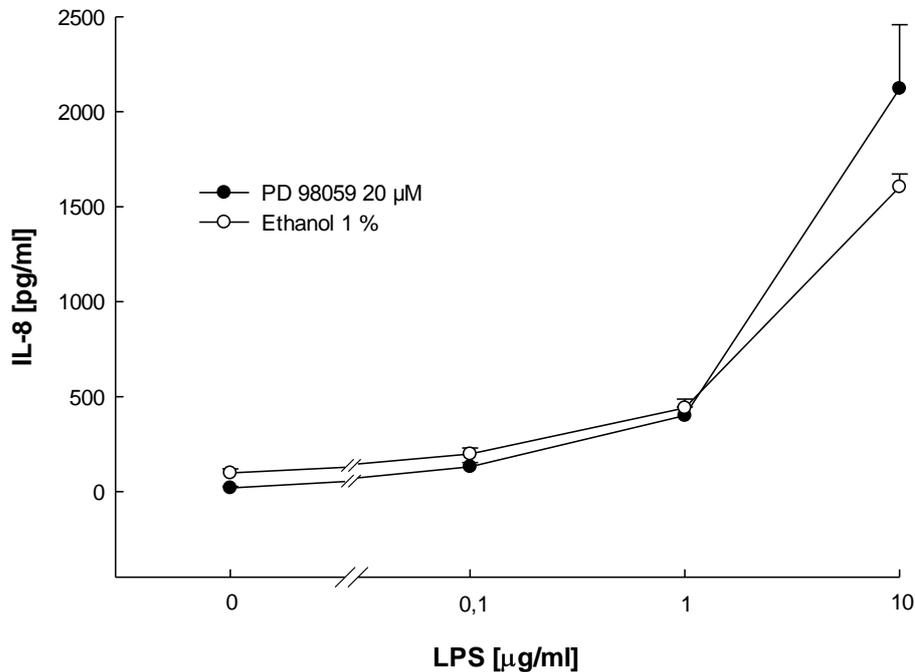


Abbildung 4.16: Hemmung der IL-8-Sekretion durch PD 98059

Die BEAS-2B-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von 20 μM PD 98059 für 24 h mit LPS inkubiert. Die Messung des IL-8 erfolgte mit ELISA. $n = 5$. Die Kurven sind nicht statistisch signifikant voneinander verschieden.

PD 98059 ist ein nicht-kompetitiver allosterischer Inhibitor der MAP-Kinase-Kinasen MEK 1 und 2, die stromaufwärts der ERK 1 und 2 auftreten und diese phosphorylieren. Die Substanz bindet die inaktive Form der MEK und verhindert somit deren Phosphorylierung durch Raf. Abbildung 4.16 zeigt eine geringe Verschiebung der Kurve. Zwar liegt bei einer LPS-Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ der Wert in Anwesenheit des Antagonisten über dem der Kontrolle, auf Grund der hohen Standardabweichung ist dieser Unterschied aber nicht statistisch signifikant.

Der zweite Teilweg der MAPK-Kaskade, der p38-Weg, kann durch die Substanz SB 202190 inhibiert werden, die die p38-MAPK spezifisch hemmt. Auch hierzu wurden Versuche durchgeführt, bei denen eine Stunde vor der Inkubation mit LPS 10 μM SB 202190 zugegeben wurde. Da der Stoff nur in DMSO löslich ist, musste auch den Kontrollen DMSO in den entsprechenden Konzentrationen zugesetzt werden.

Wie aus Abbildung 4.17 ersichtlich ist, führt der Zusatz des p38-Inhibitors zu einer statistisch signifikanten Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve.

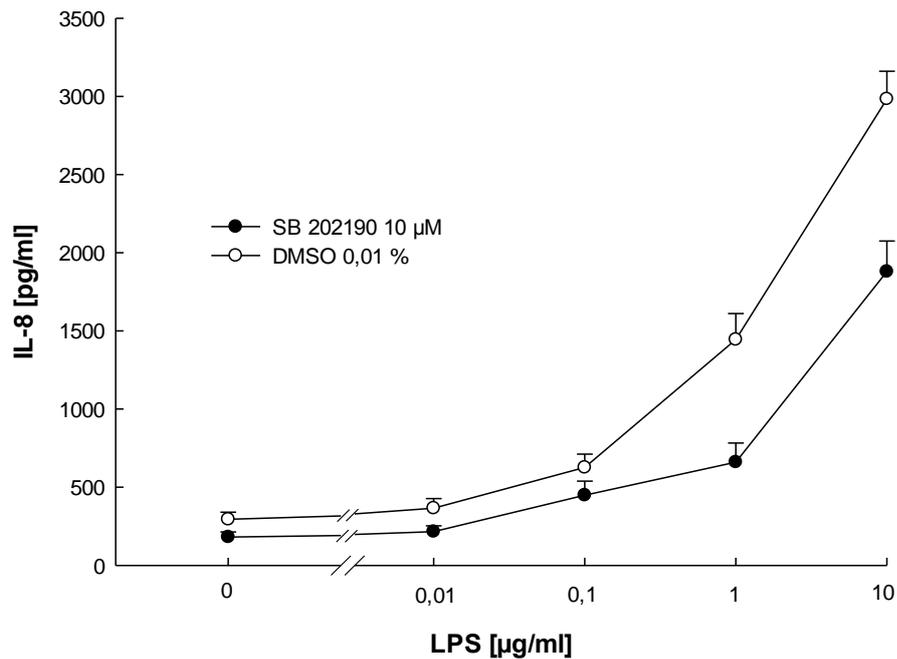


Abbildung 4.17: Hemmung der IL-8-Sekretion durch SB 202190

Die BEAS-2B-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von 10 µM SB 202190 für 24 h mit LPS inkubiert. Die Messung des IL-8 erfolgte mit ELISA. $n = 3$. Die Kurvenverläufe sind statistisch signifikant voneinander verschieden ($p < 0,01$).

Als Inhibitor des JNK-Teilweges steht SP 600125 zur Verfügung; der Einfluss dieser Substanz in verschiedenen Konzentrationen auf die LPS-induzierte IL-8-Sekretion an BEAS-2B-Zellen ist in Abbildung 4.18 dargestellt. Die Kurvenverläufe sind bei beiden Konzentrationen statistisch signifikant voneinander verschieden, wobei sich bei 20 µM SP 600125 ein stärkerer inhibitorischer Effekt der Substanz zeigt.

Somit führt der Zusatz eines spezifischen Inhibitors aller drei MAPK-Wege zu einer unterschiedlich starken Hemmung der IL-8-Sekretion. Es kann also davon ausgegangen werden, dass alle diese Kinasen – in unterschiedlichem Ausmaß – an der durch LPS vermittelten und letztlich in der Freisetzung von IL-8 mündenden Signalkaskade beteiligt sind.

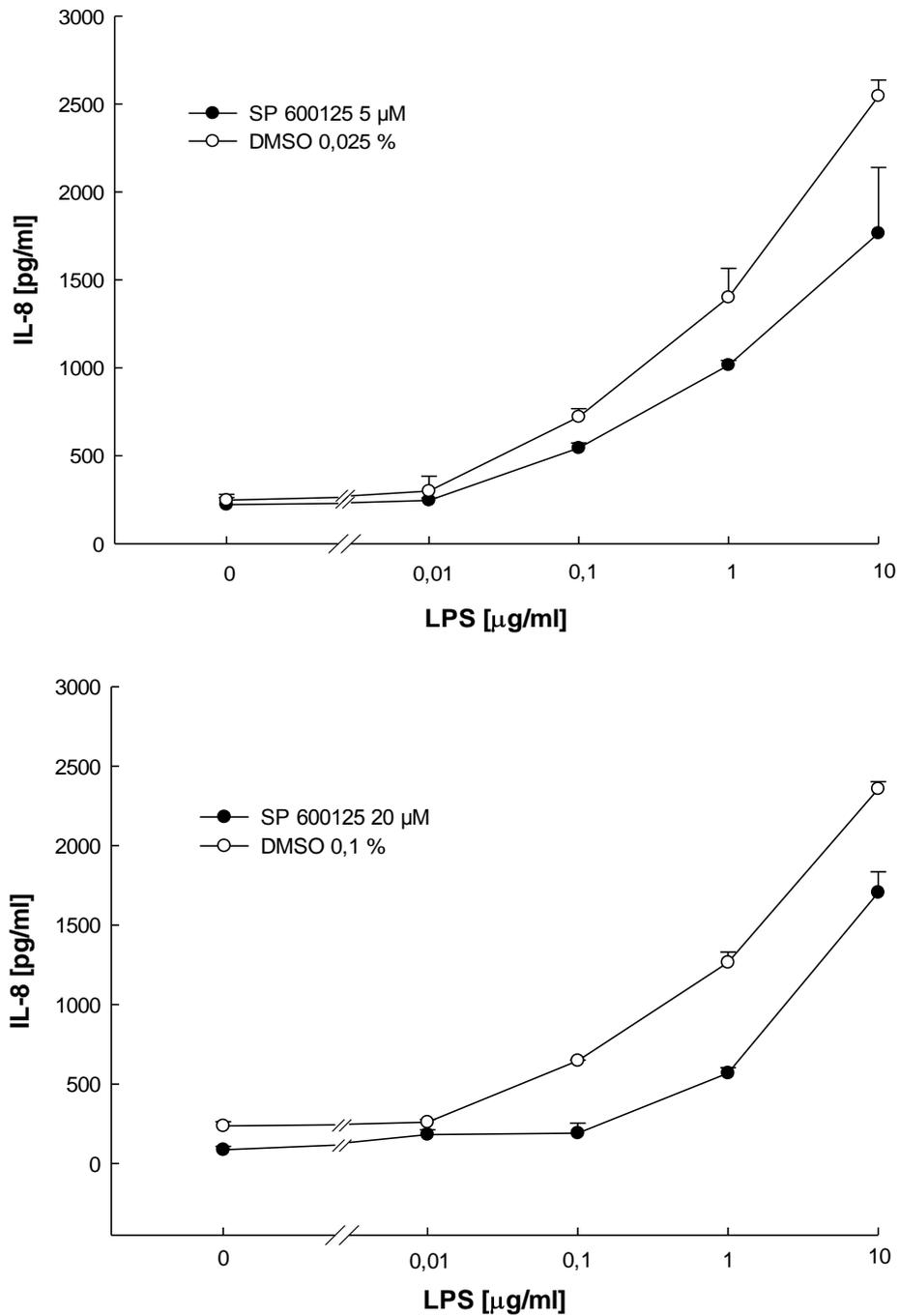


Abbildung 4.18: Hemmung der IL-8-Sekretion durch SP 600125

Die BEAS-2B-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von 5 µM bzw. 20 µM SP 600125 für 24 h mit LPS inkubiert. Die Messung des IL-8 erfolgte mit ELISA. n = 3. Die Kurvenverläufe sind jeweils statistisch signifikant voneinander verschieden ($p < 0,01$).

4.6.3.2 Tyrosinkinasen

An der intrazellulären Signaltransduktion sind Tyrosinkinasen in vielfältiger Form beteiligt, z. B. als Bindeglied zwischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und MAPK. Somit erschien es interessant zu sehen, ob diese auch bei der LPS-vermittelten IL-8-Ausschüttung von BEAS-2B-Zellen eine Rolle spielen, an der MAPK nach obigen Ergebnissen beteiligt sind.

Mit Genistein steht ein potenter Hemmstoff verschiedener Tyrosinkinasen zur Verfügung; Serin-/Threoninkinasen werden von ihm nicht gehemmt. Die Substanz wurde in den Konzentrationen 10 μM und 100 μM eingesetzt. Die entsprechenden Ethanolkonzentrationen (0,1 und 1 %) wurden als Kontrolle ebenfalls getestet, da Genistein sich nur in Ethanol löst. Wie Abbildung 4.19 zeigt, bewirkt bereits 10 μM Genistein eine statistisch signifikante Hemmung der IL-8-Freisetzung. Bei 100 μM Genistein ist der Effekt noch wesentlich stärker ausgeprägt; selbst 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS bewirken nur noch einen geringen Anstieg. Somit kann von einer Beteiligung von Tyrosinkinasen am LPS-IL-8-Signalweg in BEAS-2B-Zellen ausgegangen werden.

4.6.3.3 PI3-Kinase

Lipide sind nicht nur Bestandteil der Zellmembran, sondern spielen darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Signalweitergabe ins Zellinnere, da sie ähnlich wie Proteine durch Phosphorylierung ihre Struktur und damit auch ihre Funktion ändern. Die PI3-Kinase (Phosphoinositid-3-Kinase) gehört zu den Lipidkinasen und phosphoryliert Lipide, die einen Inositolring tragen. Als Inhibitor der PI3-Kinasen wurde bei den durchgeführten Versuchen LY 294002 in einer Konzentration von 25 μM eingesetzt. Auch hier sollte über eine verminderte IL-8-Ausschüttung nach LPS-Stimulation in Anwesenheit des Inhibitors auf eine Beteiligung der PI3-Kinase geschlossen werden.

Aus Abbildung 4.20 geht hervor, dass in Anwesenheit von LY 294002 eine deutliche Hemmung der IL-8-Ausschüttung erreicht wird. Bis zu einer LPS-Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ ist die Sekretion fast vollständig blockiert, und auch bei der höchsten eingesetzten Konzentration (10 $\mu\text{g/ml}$) ist ein mehr als 50 %iger Rückgang zu beobachten. Auch die PI3-Kinase scheint also an der LPS-vermittelten IL-8-Sekretion von BEAS-2B-Zellen beteiligt zu sein.

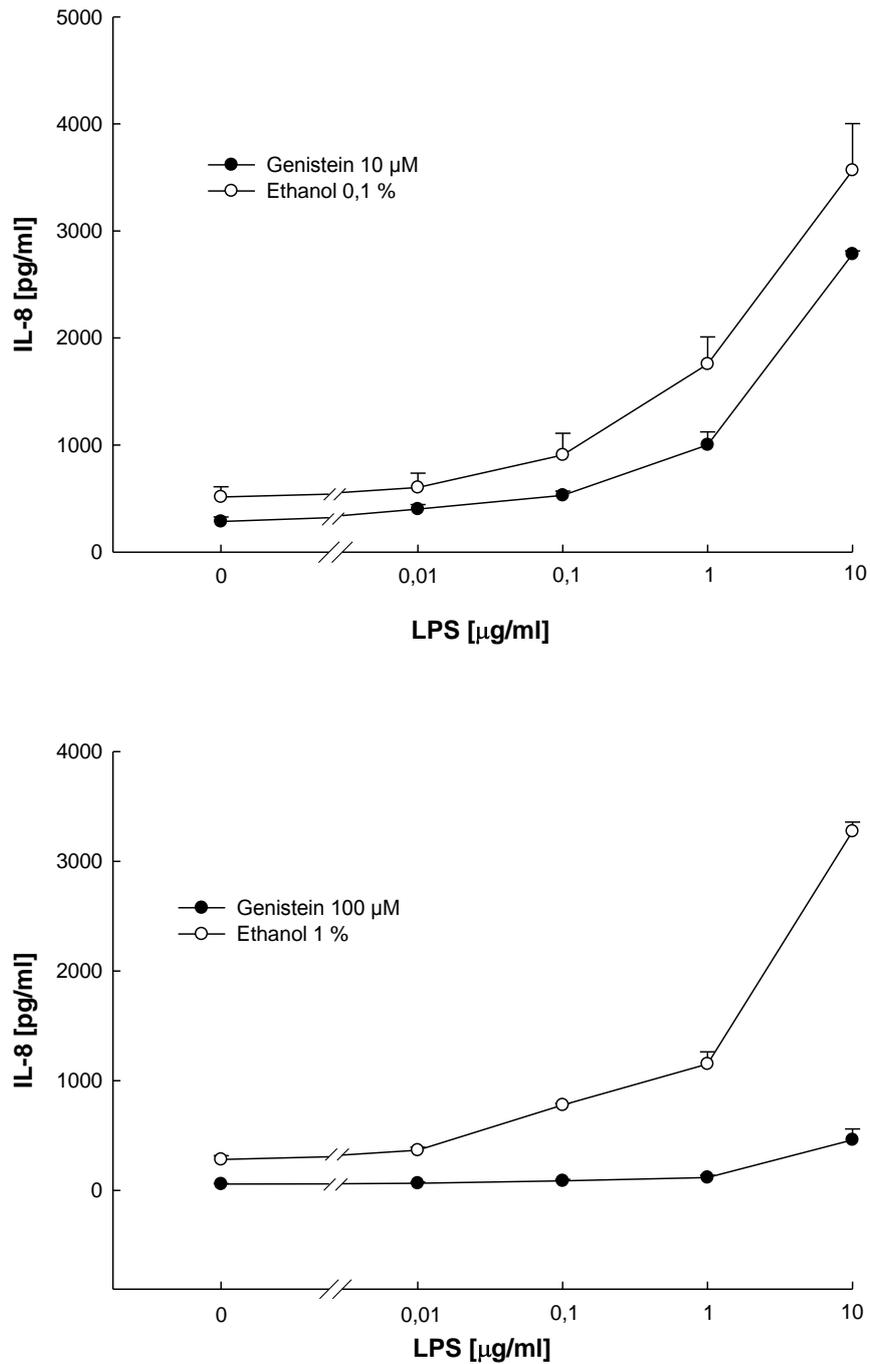


Abbildung 4.19: Hemmung der IL-8-Sekretion durch Genistein

Die BEAS-2B-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von 10 µM bzw. 100 µM Genistein für 24 h mit LPS inkubiert. Genistein wurde in 0,1 bzw. 1 % Ethanol gelöst. Die Messung des IL-8 erfolgte mit ELISA. $n = 3$. Die Kurvenverläufe sind statistisch signifikant voneinander verschieden ($p < 0,01$).

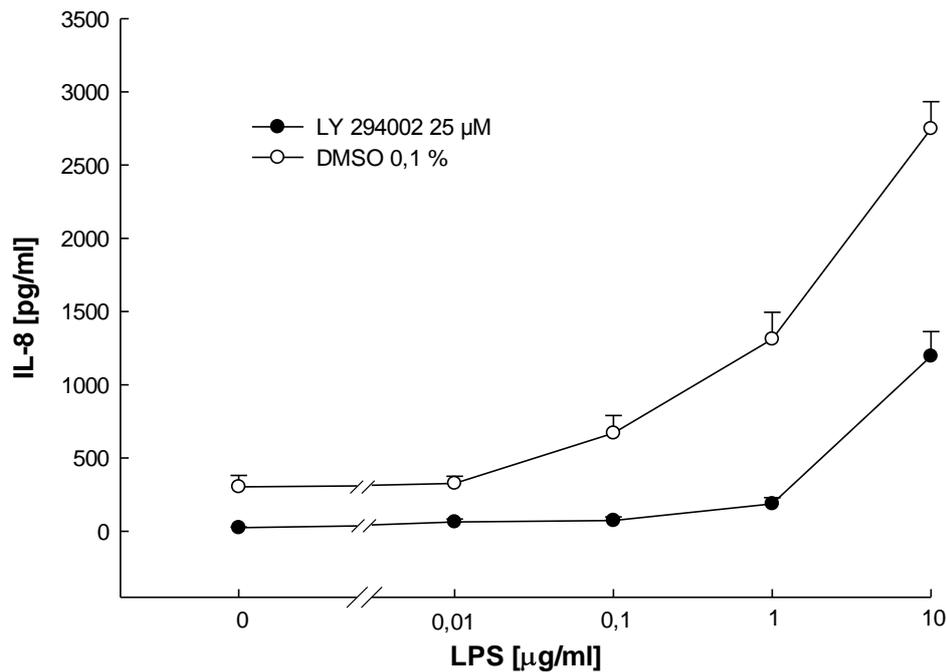


Abbildung 4.20: Hemmung der IL-8-Sekretion durch LY 294002

Die BEAS-2B-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von 25 µM LY 294002 für 24 h mit LPS inkubiert. Die Messung des IL-8 erfolgte mit ELISA. $n = 3$. Die Kurvenverläufe sind statistisch signifikant voneinander verschieden ($p < 0,01$).

4.6.3.4 IRAK

Die IRAK (*Interleukin-1-receptor associated kinase*) ist eine intrazelluläre Kinase, die durch MyD88 aktiviert wird, welches wiederum dem TLR4/CD14-Komplex nachgeschaltet ist. Der entsprechende Signalweg mündet schließlich in der Aktivierung von NFκB und der Hochregulierung verschiedener proinflammatorischer Gene. Diese Erkenntnisse beziehen sich jedoch auf andere Zelltypen; an BEAS-2B-Zellen ist noch nichts über die Beteiligung der IRAK an der LPS-Aktivierung bekannt. Durch Zusatz des IRAK-1/4-Inhibitors I sollte festgestellt werden, ob eine Hemmung des Enzyms zu einer verminderten IL-8-Sekretion führt.

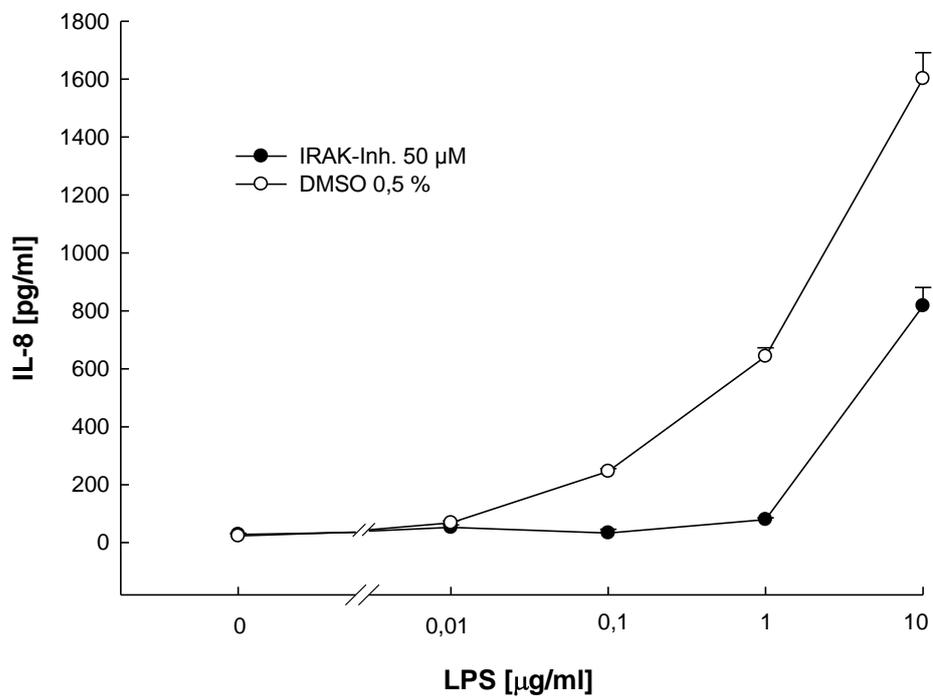
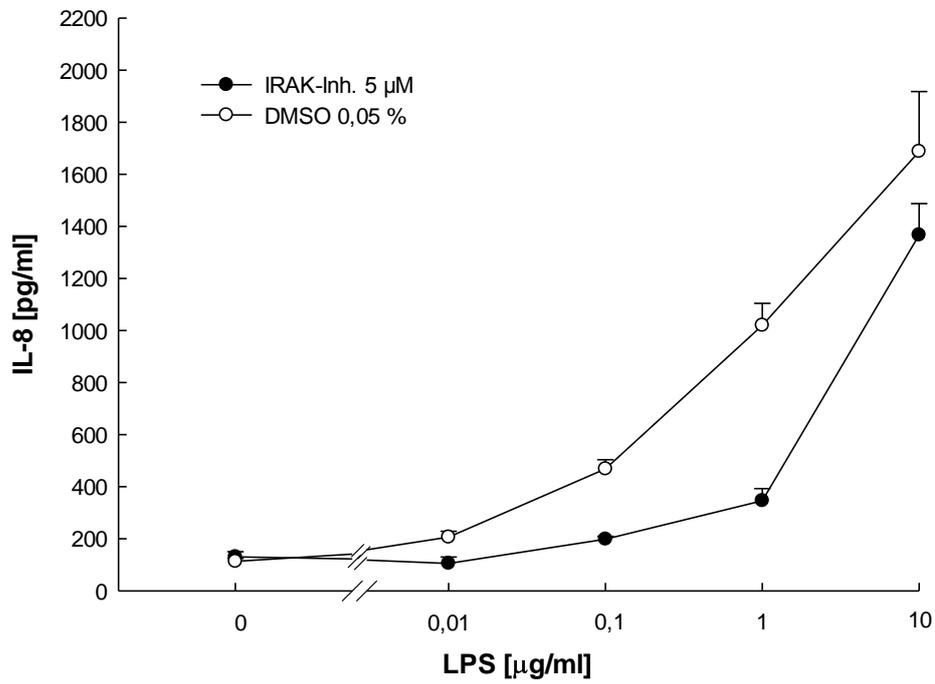


Abbildung 4.21: Beeinflussung der IL-8-Sekretion durch den IRAK-1/4-Inhibitor

Die BEAS-2B-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von 5 µM bzw. 50 µM IRAK-1/4-Inhibitor I (gelöst in 0,05 bzw. 0,5 % DMSO) 24 h mit LPS inkubiert. Die Messung des IL-8 erfolgte mit ELISA. n = 3. Die Kurvenverläufe sind statistisch signifikant voneinander verschieden ($p < 0,01$).

4.6.4 Beteiligung des IL-8-Rezeptors

Von einer Zelle ausgeschüttete Zytokine regulieren häufig ihre eigene Freisetzung im Sinne eines positiven oder negativen Feedback-Mechanismus. Entweder wird die Sekretion gefördert, um die Immunantwort zu verstärken, oder es kommt zu einer Hemmung, um eine überschießende Reaktion zu vermeiden. Nötig ist hierzu ein Rezeptor für das entsprechende Zytokin auf der Oberfläche derselben oder benachbarter Zellen.

Um zu untersuchen, ob ein solcher Mechanismus bei der hier beobachteten Reaktion eine Rolle spielt, wurde dem Reaktionsgemisch SB 225002 zugesetzt. Dies ist ein Antagonist am CXCR2-Rezeptor, an den Interleukin-8 bindet. Ob der Rezeptor von BEAS-2B-Zellen exprimiert wird, ist bisher nicht bekannt. Eine Veränderung der IL-8-Ausschüttung in Anwesenheit des Antagonisten würde auf einen Feedbackmechanismus hindeuten.

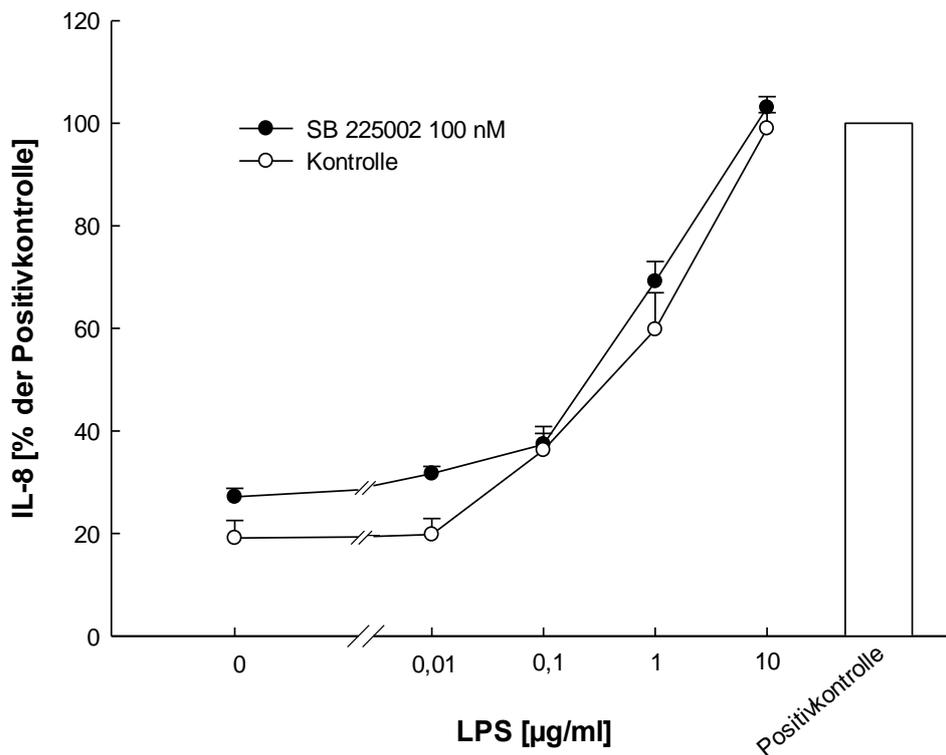


Abbildung 4.22: Beeinflussung der IL-8-Sekretion durch den CXCR2-Rezeptor-Antagonisten SB 225002

Die BEAS-2B-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von 100 nM SB 225002 für 24 h mit LPS inkubiert. Die Messung des IL-8 erfolgte mit ELISA. Als Positivkontrolle dienten je 5 ng/ml TNF α und IFN γ . n = 6. Die Kurvenverläufe sind nicht statistisch signifikant voneinander verschieden ($p = 0,15$).

Abbildung 4.22 zeigt, dass SB 225002 im unteren Kurvenbereich die IL-8-Sekretion verstärkt. Obwohl die Kurven sich insgesamt nicht statistisch signifikant unterscheiden, zeigt ein Vergleich der Einzelwerte bei einer LPS-Konzentration von 0,01 $\mu\text{g/ml}$ einen statistisch signifikanten Anstieg von $19,1 \pm 3,4 \%$ auf $31,7 \pm 1,4 \%$ der Positivkontrolle ($p = 0,017$).

4.6.5 Beteiligung des NF κ B-Weges

Viele intrazelluläre Signalwege münden in eine Translokation des Transkriptionsfaktors NF κ B in den Zellkern, woraufhin die Expression verschiedener proinflammatorischer Gene heraufreguliert wird. Mit dem membrangängigen Peptid SN50 steht eine Substanz zur Verfügung, die die Translokation des aktiven NF κ B-Komplexes in den Zellkern verhindert. Aus Abbildung 4.23 wird deutlich, dass die Anwesenheit von SN50 im Versuchsansatz die Produktion von IL-8 nach LPS-Stimulation verringert; an der Heraufregulierung des entsprechenden Gens ist also NF κ B beteiligt.

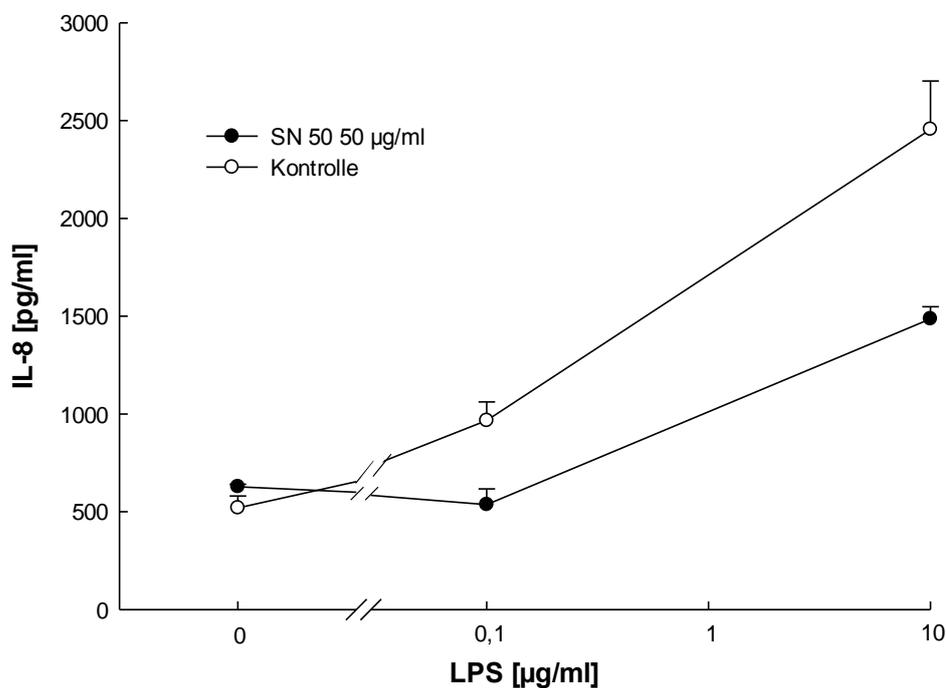


Abbildung 4.23: Beeinflussung der IL-8-Sekretion durch den NF κ B-Inhibitor SN50

Die BEAS-2B-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von 50 $\mu\text{g/ml}$ SN50 24 h mit LPS inkubiert. Die Messung des IL-8 erfolgte mit ELISA. Die Kurvenverläufe sind statistisch signifikant voneinander verschieden ($p < 0,01$).

4.6.6 Einfluss von Ethanol und Ethylpyruvat

Bei den obigen Versuchen wurde gelegentlich Ethanol als Lösungsmittel für die Testsubstanzen verwendet, wenn diese in wässrigen Medien unlöslich waren. Zwar wurde jedes Mal eine Kontrolle mit der entsprechenden Ethanolkonzentration durchgeführt, dennoch scheint die Frage interessant, ob auch das Ethanol selbst einen Einfluss auf die LPS-induzierte IL-8-Sekretion hat.

Chronischer Ethanolabusus kann ebenso wie eine akute Ethanolintoxikation zu einer vermehrten Anfälligkeit für pulmonale Infektionen führen, z. B. mit Pneumokokken oder *Klebsiella pneumoniae*. Johansson *et al.* untersuchten den Einfluss von Ethanol auf die Immunologie der Alveolarepithelzelllinie A549 und stellten unter anderem fest, dass die durch TNF α und IL-1 β induzierte Produktion von IL-8 in Anwesenheit von Ethanol vermindert ist (157). Außerdem reduziert Ethanol in hohen Konzentrationen (1 %) die durch LPS von *E. coli* hervorgerufene IL-8-Sekretion an HUVEC-Zellen, wohingegen 0,01 % Ethanol zu einem leichten Anstieg der IL-8-Sekretion führt (158).

An BEAS-2B-Zellen wurden Konzentrations-Wirkungskurven mit LPS (0,1 bis 10 $\mu\text{g/ml}$) in An- oder Abwesenheit von 0,1 % bzw. 0,5 % Ethanol aufgenommen. Höhere Konzentrationen werden von den Zellen nicht vertragen. Es stellte sich heraus, dass Ethanol unter diesen Bedingungen keinerlei Einfluss auf die LPS-induzierte IL-8 Sekretion hat (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse von Johansson *et al.* könnten zu dem Gedanken führen, Ethanol als Inhibitor inflammatorischer Reaktionen einzusetzen; wegen der ZNS-Gängigkeit und den bekannten Nebenwirkungen des Ethanols kommt dies jedoch nicht in Frage, was die Autoren zu der Suche nach einem entsprechenden Ersatzstoff veranlasste. Der Ester Ethylpyruvat zeigte an HUVECs sogar noch weit stärkere Effekte als Ethanol selbst, sowohl bei der Abschwächung der Sekretion von IL-8 und G-CSF als auch bei Expression von Adhäsionsmolekülen und der Translokation von NF κ B (159).

An dem im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchten System zeigte Ethylpyruvat in Konzentrationen von 1 mM und 10 mM ebensowenig einen Effekt auf die durch LPS hervorgerufene IL-8-Sekretion wie Ethanol (Daten nicht gezeigt).

4.6.7 Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind an zahlreichen inflammatorischen Vorgängen beteiligt. Konzentrationsabhängig dienen sie der Abwehr von Fremdorganismen, können aber auch körpereigene Zellen schädigen.

Es sollte untersucht werden, ob ROS an den beobachteten proinflammatorischen Effekten von Lipopolysacchariden beteiligt sind. Dabei wurde eine indirekte Methode angewandt, wie von Bhattacharyya *et al.* beschrieben: Die Substanz Tempol (4-Hydroxytetramethylpiperidin-1-oxyl) wirkt als „Quencher“ für ROS, da es als SOD-Mimetikum aus Superoxidradikalen H_2O_2 und H_2O bilden kann und die Radikale somit inaktiviert. Da die IL-8-Sekretion humaner Colonepithelzellen nach LPS-Inkubation in Anwesenheit von Tempol reduziert war, kann davon ausgegangen werden, dass Sauerstoffradikale an dem Signalweg beteiligt sind, der letztlich zur Ausschüttung von IL-8 führt (160).

An BEAS-2B-Zellen wurde Tempol in Konzentrationen von 0,1 μM und 1 μM eingesetzt und die Inkubationszeit wurde zwischen 2 und 24 h variiert; ein hemmender Effekt des Tempols konnte jedoch bei keiner der eingesetzten LPS-Konzentrationen (0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bis 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

4.6.8 Einfluss von Ingwer-Inhaltsstoffen

4.6.8.1 Extrakte

Zwei verschiedene Ingwer-Extrakte der Firma Finzelberg wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die LPS-induzierte IL-8-Sekretion an BEAS-2B-Zellen zu hemmen: ein Spissumextrakt und ein öliger Spezialextrakt mit einem Scharfstoffgehalt von über 25 %. In der Literatur wird v. a. die Scharfstofffraktion für die antiinflammatorische Wirkung des Ingwers verantwortlich gemacht. In den Abbildungen 4.24 und 4.25 ist dargestellt, wie sich die 30-minütige Vorinkubation der Zellen mit einem der beiden Extrakte in verschiedenen Konzentrationen auf die IL-8-Sekretion nach anschließender 24-stündiger Behandlung mit verschiedenen LPS-Konzentrationen auswirkt. Der Spissumextrakt führt zwar zu einer tendenziellen Abnahme der IL-8-Sekretion; statistisch signifikant ist der Effekt jedoch nicht.

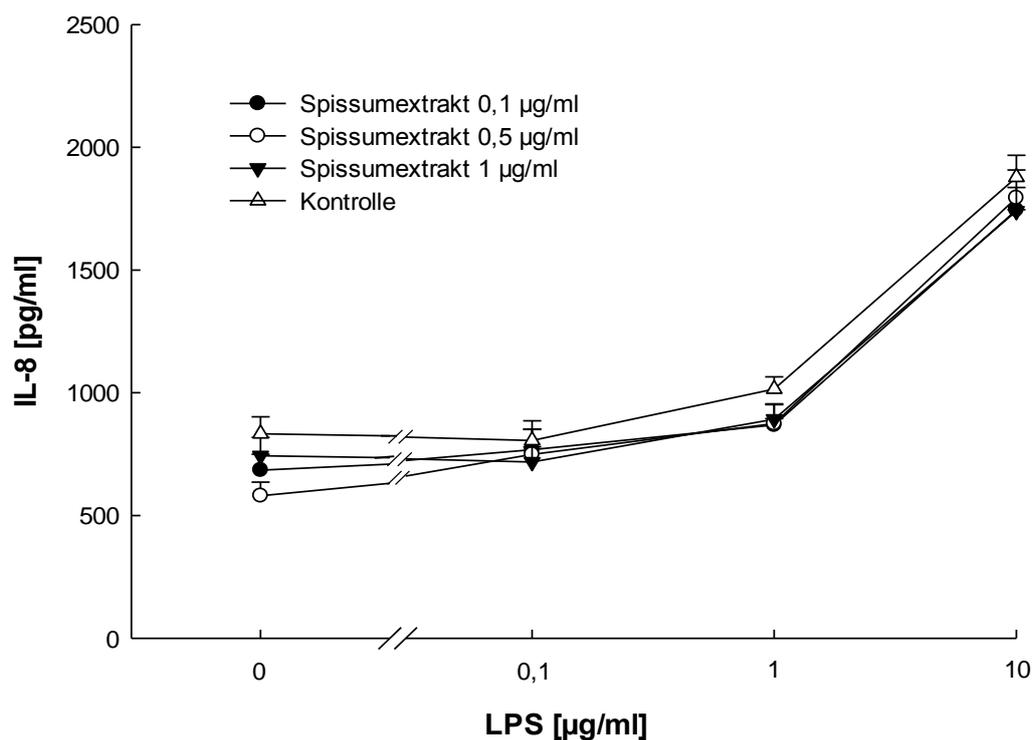


Abbildung 4.24: Beeinflussung der IL-8-Sekretion durch einen Ingwer-Spissumextrakt

Die BEAS-2B-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit des Ingwer-Spissumextrakts für 24 h mit LPS inkubiert. Die Messung des IL-8 erfolgte mit ELISA. $n = 3$. Die Kurvenverläufe unterscheiden sich nicht statistisch signifikant von der Kontrolle.

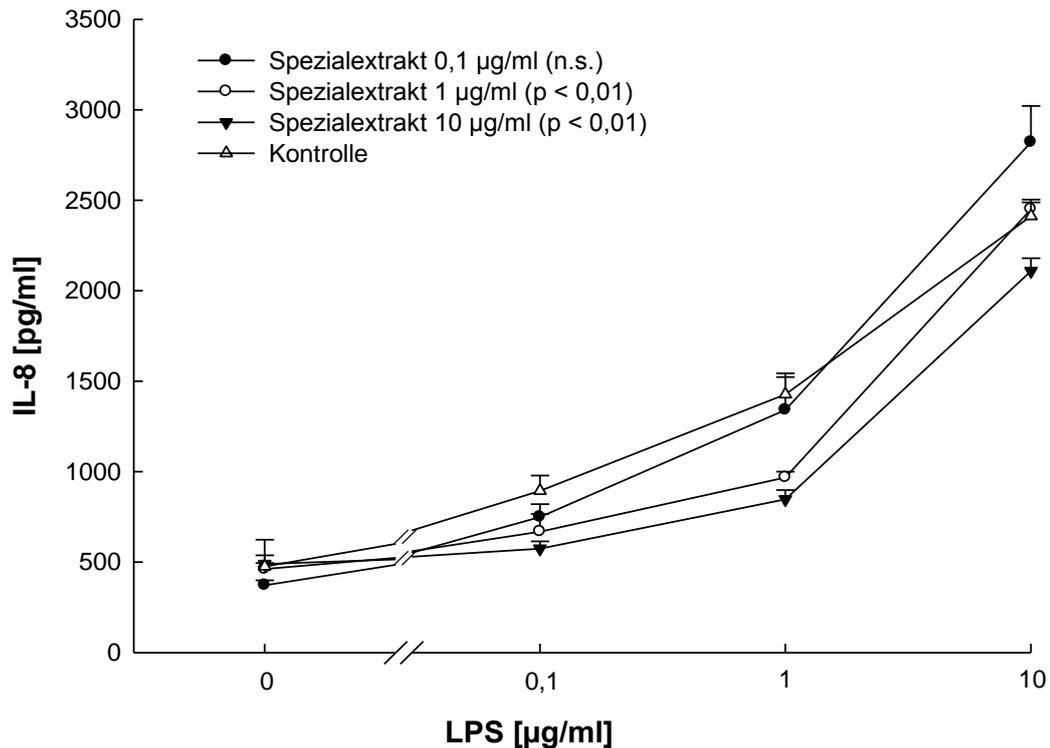


Abbildung 4.25: Beeinflussung der IL-8-Sekretion durch einen Ingwer-Spezialextrakt

Die BEAS-2B-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit des Ingwer-Spezialextrakts für 24 h mit LPS inkubiert. Die Messung des IL-8 erfolgte mit ELISA. $n = 3$. Bei 1 und 10 µg/ml ist die Rechtsverschiebung der Kurve statistisch signifikant gegenüber der Lösemittelkontrolle.

4.6.8.2 Scharfstoffe

Als Vertreter der Scharfstofffraktion wurden 6-Gingerol und 6-Shogaol auf ihre IL-8-hemmende Wirkung untersucht; dabei wurden Konzentrationen von 0,1 bis 100 µM des jeweiligen Scharfstoffs eingesetzt und die Auswirkung einer 30-minütigen Vorinkubation auf den Effekt von 0,1 und 1 µg/ml LPS gemessen.

Obwohl der scharfstoffangereicherte Spezialextrakt eine stärkere Wirkung aufwies als der Gesamtextrakt, konnte weder mit 6-Gingerol noch mit 6-Shogaol eine statistisch signifikante Hemmung der LPS-induzierten IL-8-Sekretion erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

4.6.8.3 Ätherisches Öl und Bestandteile

Da dem ätherischen Ingweröl u. a. eine entzündungshemmende Wirkung zugeschrieben wird, wurde auch dieses auf seine Fähigkeit hin untersucht, die LPS-vermittelte IL-8-Sekretion abzuschwächen. Auch einige Inhaltsstoffe des ätherischen Öls wurden getestet.

Aus Abbildung 4.26 geht hervor, dass das ätherische Öl in einer Konzentration von 0,04 $\mu\text{l/ml}$ die IL-8-Sekretion hemmt; bei 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS sogar um ca. 50 %. Auch bei 0,004 $\mu\text{l/ml}$ ätherischem Öl zeigt sich bereits eine Rechtsverschiebung der Kurve; diese ist jedoch nicht statistisch signifikant ($p = 0,21$). Bei der ebenfalls untersuchten 10fach höheren Konzentration (0,4 $\mu\text{l/ml}$) waren die Zellen größtenteils tot. Man könnte daher vermuten, dass auch bei 0,04 $\mu\text{l/ml}$ ein Teil der Zellen abgestorben war und die verminderte IL-8-Sekretion aus der geringeren Zellzahl resultiert. Allerdings müssten sich die Werte dann auch bei dem ebenfalls durchgeführten Versuch ohne Zusatz von LPS signifikant unterscheiden; diese Werte sind mit und ohne ätherisches Öl jedoch nicht voneinander verschieden ($p = 0,27$). Man kann also davon ausgehen, dass der Effekt tatsächlich auf die antiinflammatorische Wirkung des ätherischen Öls zurückzuführen ist.

Anschließend wurde anhand einiger Beispiele untersucht, welche Bestandteile des ätherischen Öls für die antiinflammatorische Wirkung verantwortlich sein könnten.

Als Vertreter der Sesquiterpene wurde ar-Curcumen getestet, das vor allem im Verlauf der Lagerung der Droge oder des ätherischen Öls aus α -Zingiberen entsteht. Abb. 4.27 zeigt, dass ar-Curcumen in einer Konzentration von 1 mM die IL-8-Sekretion deutlich hemmt. Niedrigere Konzentrationen zeigten keinen statistisch signifikanten Effekt (Daten nicht gezeigt).

Das Monoterpen α -Pinen verursacht in einer Konzentration von 10 μM vor allem im Kurvenbereich mit niedrigen Konzentrationen eine Rechtsverschiebung (Abb. 4.27). Höhere α -Pinen-Konzentrationen führten nicht mehr zu einer Hemmung der IL-8-Sekretion (Daten nicht gezeigt); möglicherweise schaden so hohe Mengen den Zellen eher und führen selbst zu inflammatorischen Vorgängen, als sie vor dem Einfluss der LPS zu schützen.

Als weitere Bestandteile des ätherischen Öls wurden Citral und β -Phellandren auf ihre IL-8-vermindernde Wirkung getestet. Bei beiden Monoterpenen zeigte sich jedoch in keiner Konzentration ein statistisch signifikanter Effekt.

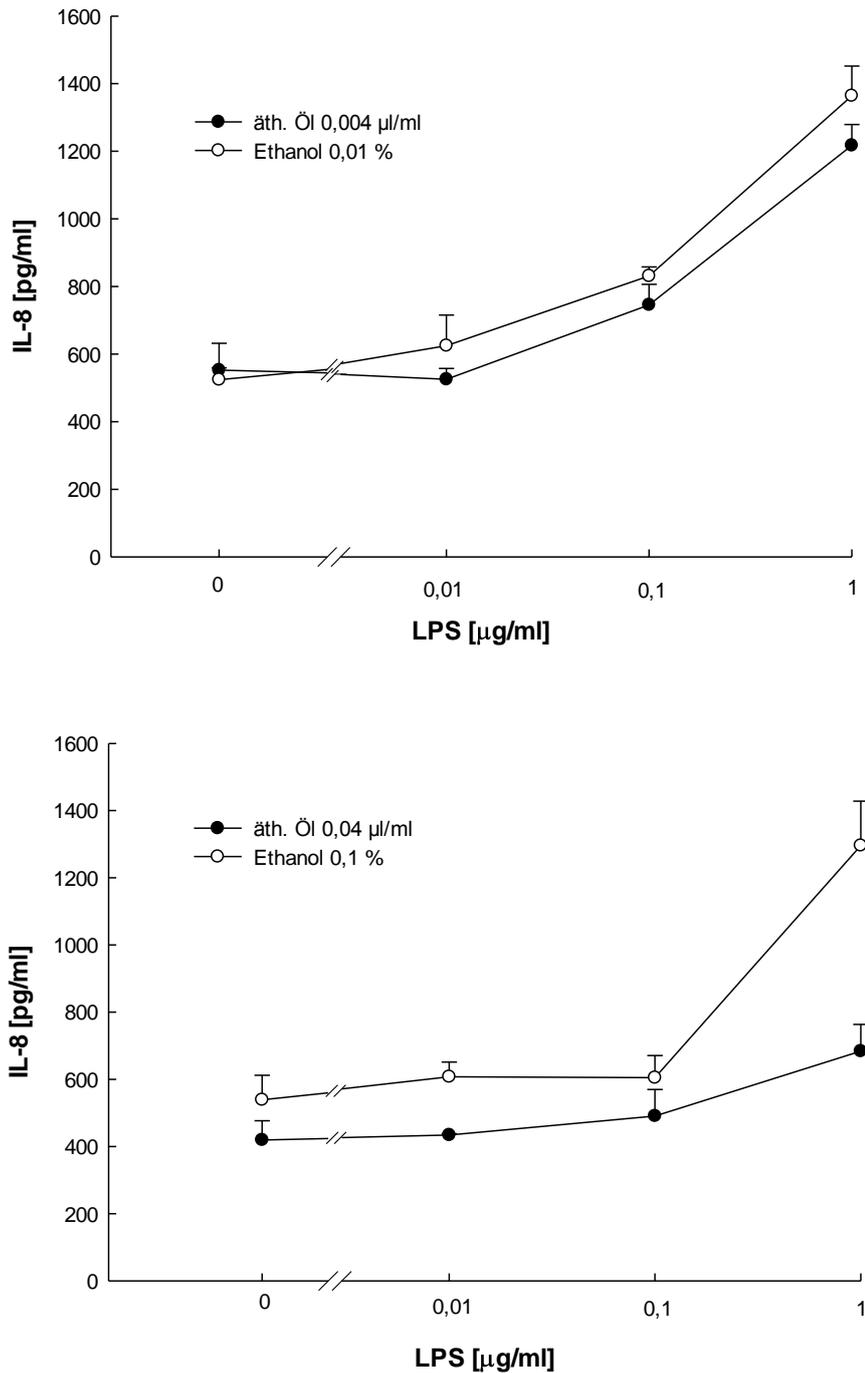


Abbildung 4.26: Einfluss von ätherischem Ingweröl auf die IL-8-Sekretion

Die BEAS-2B-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von ätherischem Ingweröl für 24 h mit LPS inkubiert. Das ätherische Öl wurde in 0,01 bzw. 0,1 % Ethanol gelöst. Die Messung des IL-8 erfolgte mit ELISA. $n = 3$. Die Kurvenverläufe sind bei der höheren Konzentration statistisch signifikant voneinander verschieden ($p < 0,01$), bei der niedrigeren Konzentration nicht.

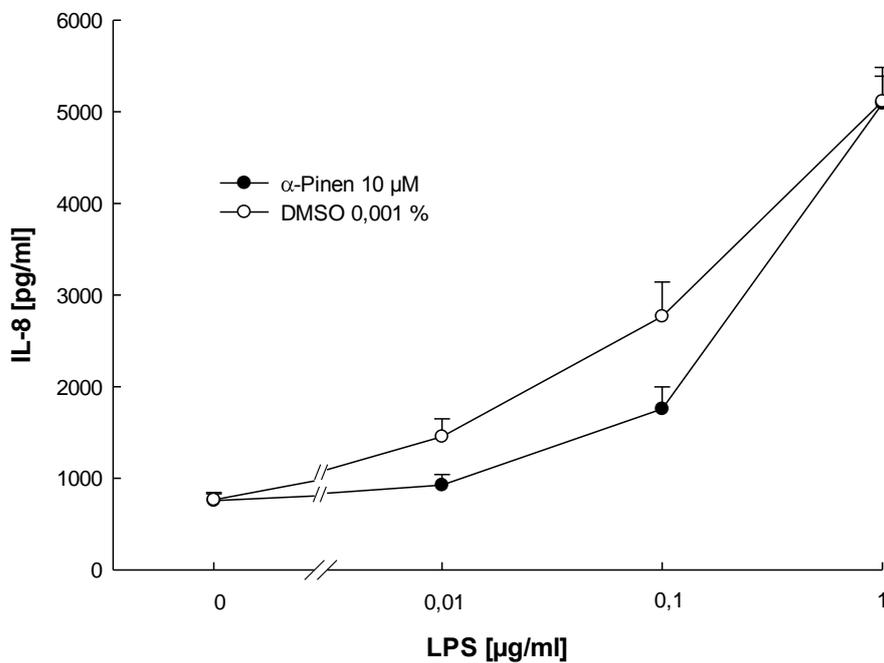
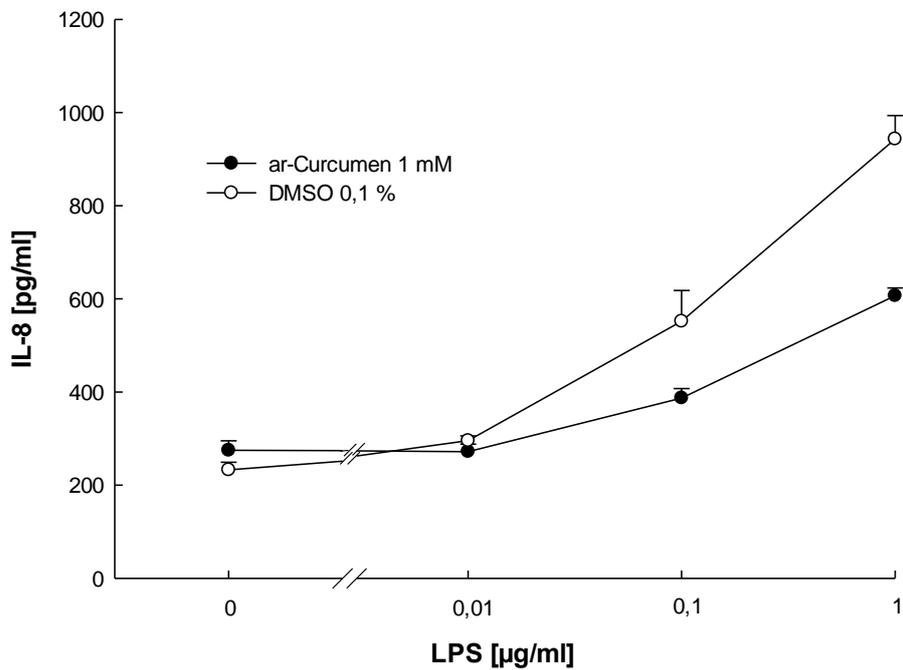


Abbildung 4.27: Einfluss von ar-Curcumen und α -Pinen auf die IL-8-Sekretion

Die BEAS-2B-Zellen wurden für 24 h mit LPS stimuliert; 30 min zuvor wurde ar-Curcumen bzw. α -Pinen zugesetzt, das in 0,1 bzw. 0,001 % DMSO gelöst war. Die Messung des IL-8 erfolgte mit ELISA. $n = 3$. Die Kurvenverläufe sind statistisch signifikant voneinander verschieden ($p < 0,01$ für ar-Curcumen, $p < 0,05$ für α -Pinen).

4.6.9 Co-Kultivierungs-Versuche

4.6.9.1 Einfluss der Co-Kultur auf die IL-8-Sekretion

Um zu untersuchen, inwieweit BEAS-2B- und U937-Zellen sich gegenseitig bei ihrer Reaktion auf LPS beeinflussen, wurden beide Zelltypen gemeinsam der LPS-Stimulation ausgesetzt, wie im Methodenteil beschrieben. Dabei wurden unterschiedliche Zellzahlverhältnisse getestet: Auf 100.000 ausgesäte BEAS-2B-Zellen pro ml kamen nach deren Konfluenz 20.000 bis 100.000 U937-Zellen in 1 ml Medium. Die anschließende Messung der IL-8-Konzentration im Überstand zeigte jedoch keinen Unterschied zwischen BEAS-2B-Zellen alleine und in Anwesenheit von U937-Zellen (Daten nicht gezeigt).

Bei der zweiten Variante wurden U937-Zellen in Medium kultiviert, das vorher als Nährmedium für die BEAS-2B-Zellen verwendet worden war. Dieses wird als *epithel cell conditioned medium* (ECCM) bezeichnet. Wie aus Abb. 4.28 ersichtlich, wird zumindest bei einer LPS-Konzentration von 100 ng/ml deutlich mehr IL-8 produziert, wenn die Kultur in ECCM erfolgte: Hier zeigt sich ein Anstieg von $0,1 \pm 0,4$ pg/ml auf $7,3 \pm 2$ pg/ml.

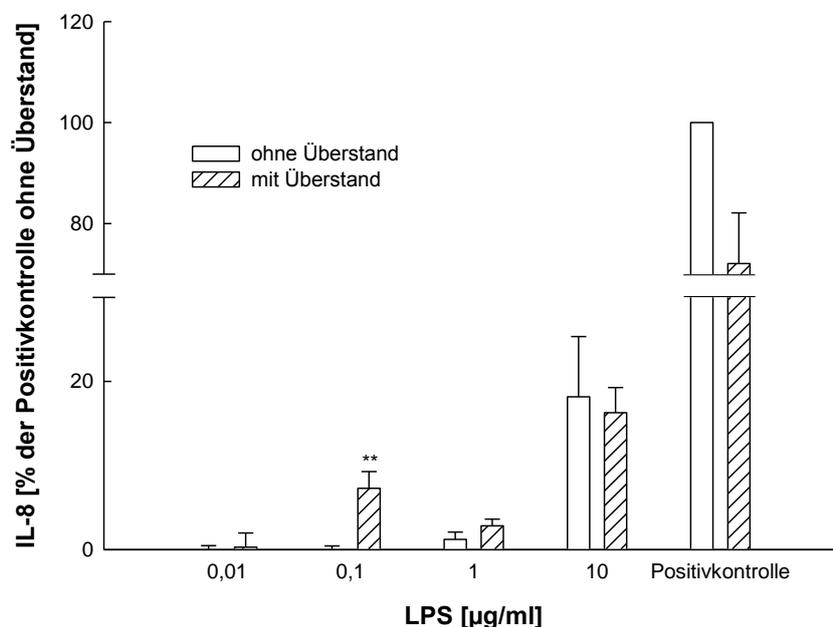


Abbildung 4.28: Beeinflussung der IL-8-Sekretion von U937-Zellen durch BEAS-2B-ECCM

Die U937-Zellen (100.000/ml) wurden in ECCM für 24 h mit LPS inkubiert. Die Messung des IL-8 erfolgt mit ELISA. Je 5 ng/ml TNF α und IFN γ dienten als Positivkontrolle. n = 8, ** p < 0,01.

4.6.9.2 Identifizierung der verantwortlichen Substanzen

Bei den Kombinationsversuchen mit BEAS-2B- und U937-Zellen wurde gefunden, dass die U937-Zellen stärker auf eine Stimulation mit LPS reagieren, wenn sie in ECCM kultiviert wurden. Es stellte sich also die Frage, ob die Bronchialepithelzellen eine bestimmte Substanz in ihren Überstand absondern, welche die Prämonozyten in irgendeiner Form verändert und ihre Differenzierung fördert, so dass sie anders auf LPS reagieren als sonst.

Retinsäure (*retinoic acid*, RA) und Vitamin D₃ (1,25- α -Dihydroxycholecalciferol) sind bekannte Modulatoren der Proliferation und Differenzierung verschiedener Zelltypen. Unter anderem nehmen sie Einfluss auf die CD14-Expression von U937-Zellen, d. h. auf deren Differenzierung zu vollwertigen Monozyten (35). Es erschien also interessant zu wissen, ob BEAS-2B-Zellen Retinsäure oder Vitamin D₃ sezernieren, und ob eine dieser Substanzen für die Veränderung an den U937-Zellen verantwortlich ist. Die Analyse des Zellüberstands wurde per Gradienten-HPLC durchgeführt.

Vitamin D₃ konnte in keiner der drei untersuchten Proben nachgewiesen werden und wird also nicht von BEAS-2B-Zellen sezerniert.

Wie in Abbildung 4.29 dargestellt, zeigt sich nach einer Retentionszeit von ca. 7,3 Minuten im Chromatogramm ein schwach ausgeprägter Peak. Durch Spiken mit Retinsäure wurde der Peak vergrößert; daher ist zu vermuten, dass es sich bei der Substanz um Retinsäure handelt. Eine sichere Quantifizierung war nicht möglich, allerdings genügte für diese Fragestellung die qualitative Aussage, ob BEAS-2B-Zellen Retinsäure in ihren Überstand abgeben oder nicht. Der Vergleich mit der zugesetzten Konzentration des Standards ergab eine Retinsäurekonzentration von unter 1 nM im Überstand.

Um zu untersuchen, ob die im Überstand der BEAS-2B-Zellen gefundene Retinsäure einen Einfluss auf die Reaktion von U937-Zellen auf Lipopolysaccharide ausübt, wurde folgendes Experiment durchgeführt: U937-Zellen wurden wie in den oben beschriebenen ELISA-Versuchen auf 24er-Platten ausgesät und für 24 h mit Lipopolysacchariden in einer Konzentration von 10 ng/ml bis 1 μ g/ml inkubiert. Dabei wurde einem Teil der Proben 1 nM Retinsäure zugesetzt.

Die anschließende Messung der Interleukin-8-Konzentration im Überstand zeigte jedoch keinen Unterschied zwischen den mit Retinsäure behandelten Zellen und den Kontrollen. Somit sind weder Vitamin D₃ noch Retinsäure für die veränderte Reaktion derjenigen Zellen, die mit ECCM kultiviert worden waren, verantwortlich. Die Identität der fraglichen Substanz bleibt also ungeklärt und wurde aus Mangel an Anhaltspunkten in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

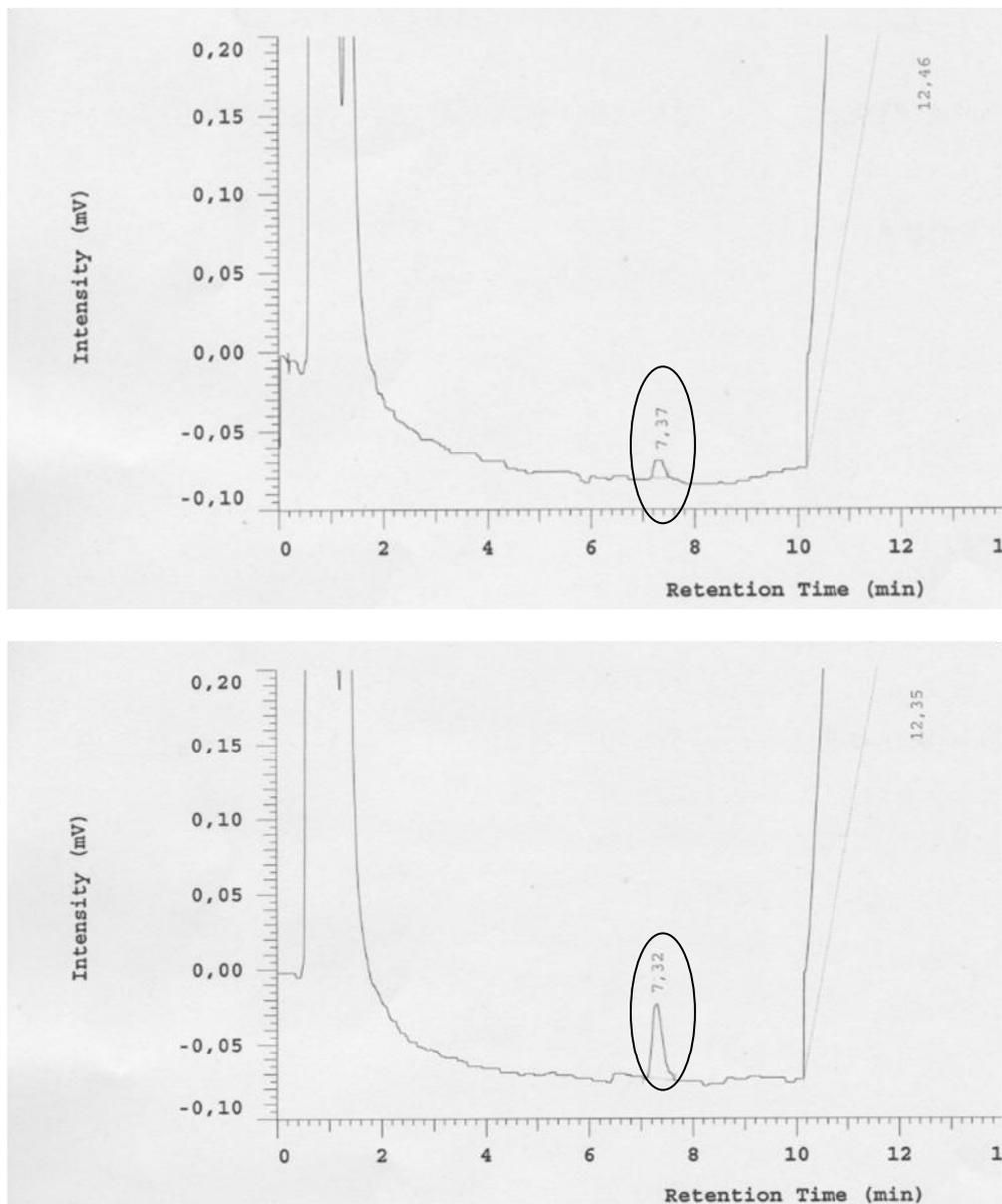


Abbildung 4.29: HPLC zum Nachweis von Retinsäure

Die obere Abbildung zeigt das Chromatogramm der nativen Probe, d. h. des Zellüberstands der BEAS-2B-Zellen. Das untere Chromatogramm stellt die Probe dar, die mit 1 nM Retinsäure-Standard gespikt war. Der Peak erscheint bei der gleichen Retentionszeit wie oben, ist aber stärker ausgeprägt.

4.7 Auswirkung von ADMA auf die Zytokinexpression in BEAS-2B-Zellen

4.7.1 TNF α

Nachdem Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) an Gefäßendothelzellen die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine fördert (142, 144), sollte untersucht werden, ob sich ähnliche Effekte auch an Bronchialepithelzellen beobachten lassen.

Da Chen *et al.* für ihre Versuche an Endothelzellen eine ADMA-Konzentration von 30 μ M einsetzten und damit gut sichtbare Effekte erzielten, wurde 30 μ M als niedrigste und 30 mM als höchste Konzentration für die Stimulation der BEAS-2B-Zellen gewählt. Nach 24 h Inkubation wurde mittels ELISA der Gehalt des proinflammatorischen Zytokins TNF α im Überstand gemessen; jedoch konnte bei keiner der eingesetzten ADMA-Konzentrationen eine messbare TNF α -Sekretion festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Auf Grund der hohen Proteinbindung von ADMA wurde die These aufgestellt, dass ADMA das durchaus gebildete Protein TNF α abfängt und somit der Detektion entzieht. Um dies zu überprüfen, wurden mehrere Standardkurven (Absorption in Units gegen die zugesetzte TNF α -Konzentration) mit TNF α bekannter Konzentration aufgenommen, wobei verschiedene Mengen ADMA zugesetzt wurden. Eine Verschiebung der Kurven durch ADMA hätte die Vermutung bestätigt. Allerdings veränderte die Anwesenheit von 100 μ M bzw. 1 mM ADMA die gemessene Absorption bei gegebener TNF α -Konzentration nicht; diese Fehlerquelle konnte also ausgeschlossen werden.

In der Literatur ist beschrieben, dass BEAS-2B-Zellen durch Substanz P zur TNF α -Produktion angeregt werden können (161). Daher wurde den Zellen Substanz P in Konzentrationen von 1 μ M bis 100 μ M für 24 h zugesetzt; in weiteren Versuchen kamen CGRP (*calcitonine gene related peptide*, 0,1 bis 10 μ M) und LPS (0,1 bis 10 μ g/ml) sowie verschiedene Kombinationen der drei Stimulantien zum Einsatz. Der Gedanke dabei war, durch ein „Anstimulieren“ mit diesen Substanzen einen eventuellen schwach additiven Effekt des ADMA detektieren zu können; daher wurde den Einzelsubstanzen bzw. den Stimulantiengemischen bei einem Teil der Versuche 1 mM ADMA zugesetzt.

Allerdings konnten unter keiner dieser Bedingungen TNF α -Werte gemessen werden, die oberhalb des niedrigsten Standards der Kalibrierkurve (11,6 pg/ml) lagen und damit aussagekräftig und verlässlich waren. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die hier verwendeten Zellen evtl. grundsätzlich nicht in der Lage sind, größere Mengen TNF α zu sezernieren.

In verschiedenen Literaturstellen finden sich Hinweise dafür, dass Bronchialepithelzellen stärker auf bestimmte Reize reagieren, wenn sie gemeinsam mit Monozyten kultiviert werden. Drumm *et al.* exponierten BEAS-2B-Zellen mit Feinstaubpartikeln und maßen die Konzentration der Interleukine 6 und 8. Deren Produktion war erhöht, wenn die Epithelzellen in Co-Kultur mit Monozyten gehalten wurden (162). Die beiden Zelltypen scheinen sich also bei inflammatorischen Vorgängen gegenseitig zu beeinflussen. Daher wurde getestet, ob der in Monokultur nicht messbare Effekt von ADMA auf die Zytokinproduktion durch gleichzeitige Anwesenheit von Monozyten verstärkt wird.

Auf konfluent gewachsene BEAS-2B-Zellen auf 24er-Platten wurden frisch isolierte humane Monozyten in einer Dichte von 20.000 oder 100.000 Zellen pro ml ausgesät und der Gehalt an TNF α nach 24-stündiger Inkubation mit ADMA (0,1 μ M bis 10 mM) gemessen; auch hier lagen die Werte unterhalb der Nachweisgrenze.

4.7.2 Interleukin-8 und RANTES

Neben TNF α spielen auch die Chemokine RANTES und Interleukin-8 eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie entzündlicher Atemwegserkrankungen; daher sollte mittels ELISA gezeigt werden, ob ADMA die Produktion dieser Mediatoren beeinflusst.

Als Positivkontrollen wurden bei diesen Versuchen je 10 ng/ml TNF α und IFN γ verwendet; diese verursachten einen deutlichen Anstieg der Sekretion des jeweiligen Chemokins und zeigten somit, dass die Zellen zur Produktion von IL-8 und RANTES in der Lage sind.

Auch auf diese Chemokine hatte die Anwesenheit von sehr hohen ADMA-Konzentrationen (bis 10 mM) keinen Einfluss. Bei Interleukin-8 wurde ein ELISA-Kit (QuantiGlo[®]) verwendet, der auf Grund eines abweichenden Messprinzips (Lumineszenz statt Absorption) eine höhere Empfindlichkeit erreicht und Mengen ab 1 pg/ml detektieren kann. Dennoch zeigte ADMA im Gegensatz zur Positivkontrolle keinen Effekt (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren wurde untersucht, ob ADMA den LPS-induzierten Anstieg von IL-8 an BEAS-2B-Zellen antagonisieren kann, wie es für L-NAME an glatten Aortamuskelzellen gezeigt werden konnte (163). Dazu wurden die Zellen für 24 h in Anwesenheit von 100 μ M bzw. 1 mM ADMA mit verschiedenen LPS-Konzentrationen inkubiert und anschließend per ELISA im Überstand die IL-8-Konzentration gemessen, wie in Kapitel 4.5 beschrieben; ADMA hatte jedoch auch in dieser Versuchsanordnung keinen Effekt (Daten nicht gezeigt).

4.7.3 Zytokin-Screening

Um einen Überblick darüber zu gewinnen, welche Zytokine von den BEAS-2B-Zellen produziert werden können – sowohl in Bezug auf ADMA als auch bei einer Positivkontrolle mit TNF α und IFN γ – wurde mittels eines Proteome Profiler[®] Arrays ein Screening auf verschiedene Zytokine durchgeführt. Die Detektion erfolgte wie bei dem Screening der MAPK durch die Schwärzung eines Röntgenfilms und die Auswertung über ein vom Hersteller mitgeliefertes Schema.

Bei der Negativkontrolle wurden bereits einige Zytokine detektiert; diese sind also offenbar konstitutiv vorhanden und werden auch ohne Stimulation in den Zellüberstand abgegeben. Es handelt sich hierbei um Gro α (*growth regulated oncogene alpha*, auch CXCL1), MIF (*migration inhibiting factor*) und PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor*, auch Serpin E1). In sehr geringen Mengen sind außerdem die Interleukine 8 und 13 vorhanden.

Die mit je 10 ng/ml TNF α und IFN γ stimulierten Zellen produzierten darüber hinaus in deutlichem Ausmaß folgende Zytokine:

RANTES (*Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted*)

IP 10 (*interferone inducible protein 10*, auch CXCL 10)

I-TAC (*interferone inducible T-cell alpha chemoattractant*, auch CXCL 11)

MCP 1 (*monocyte chemotactic protein 1*)

sICAM-1 (*soluble intracellular adhesion molecule 1*)

Interleukin-6

Interleukin-8

Schwach exprimiert sind außerdem das Chemokin C5a, Interleukin-1 α , G-CSF (Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor), Interleukin-1ra, Interleukin-17E, das CC-Chemokin I-309 und MIP 1 α (*macrophage inflammatory protein 1 α*).

Zur Testung des ADMA-Einflusses wurden die Zellen für 24 h mit 3 mM bzw. 6 mM AMDA inkubiert und die Überstände anschließend dem Screening zugeführt. Dabei wurden jedoch keine Unterschiede zur Negativkontrolle festgestellt.

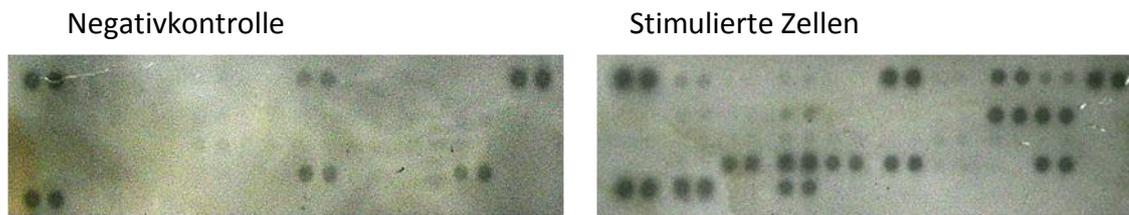


Abbildung 4.30: Einfluss von TNF α und IFN γ auf die Zytokinproduktion in BEAS-2B-Zellen

Die Zellen wurden auf 6-well-Platten ausgesät, nach Erreichen der Konfluenz 24 h mit je 10 ng/ml TNF α und IFN γ inkubiert und anschließend lysiert. Die Detektion und Auswertung erfolgte mit dem Proteome Profiler[®] Array.

Trotz des Misserfolges bezüglich ADMA konnte immerhin gezeigt werden, welche Zytokine die BEAS-2B-Zellen überhaupt zu produzieren fähig sind; die Interleukine 2, 4, 10 und 12 z. B. werden unter diesen Bedingungen überhaupt nicht gebildet. Diese Ergebnisse können für die Planung späterer Versuche von großem Nutzen sein.

4.8 Veränderung der Zilienschlagfrequenz durch ADMA

Da von anderen NO-Synthasehemmern beschrieben wurde, dass sie Einfluss auf die ziliäre Schlagfrequenz haben (147), sollte auch die Auswirkung von ADMA auf die CBF untersucht werden. Dazu wurden Explantate der Rattentrachea zum Teil für 24 h mit je 10 ng/ml TNF α und LPS vorstimuliert und anschließend ADMA in verschiedenen Konzentrationen zugefügt, wobei der Verlauf der CBF festgehalten wurde.

Die Behandlung mit 10 mM ADMA führte bei den unstimulierten Präparaten zu einer Abnahme auf $92,39 \pm 1,99$ %, bei den stimulierten Proben auf $88,79 \pm 7,82$ %. Nur der erste Wert ist signifikant von 100 % verschieden. Die Werte schwanken stark und das Ergebnis ist nicht eindeutig. Es kann nicht darauf geschlossen werden, dass die iNOS in der Rattentrachea von ADMA gehemmt wird, obwohl das in anderen Zellen der Fall ist (164) und die iNOS in der Rattentrachea sicher vorkommt (165). ADMA scheint zwar einen geringfügigen CBF-senkenden Effekt zu haben, allerdings ist die eingesetzte Konzentration von 10 mM extrem hoch und in keiner Weise physiologisch sinnvoll. Niedrigere Konzentrationen zeigten in diesem Modell keinerlei Einfluss auf die CBF.

In weiteren Versuchen wurde die Auswirkung einer Losartan-Vorbehandlung auf den ADMA-Effekt untersucht. Der Antagonist am Angiotensin II-Rezeptor wird auch mit ADMA in Verbindung gebracht. Chen *et al.* wiesen nach, dass die durch ADMA verursachte Ausschüttung von TNF α und IL-8 an Endothelzellen durch eine Vorinkubation mit Losartan aufgehoben werden kann (144). Außerdem senkt Losartan die ADMA-Plasmakonzentration bei Patienten mit essentieller Hypertonie (166).

Nach einer Vorbehandlung mit 100 μ M Losartan für eine Stunde wurde unter Mikroskopkontrolle 5 mM ADMA zugegeben und in den folgenden 10 Minuten 10 CBF-Werte aufgenommen. Der jeweils niedrigste Wert in diesem Zeitraum wurde zur Auswertung herangezogen. Bei den nicht mit Losartan vorbehandelten Proben sank die CBF auf $89,11 \pm 2,03$ % ($p = 0,033$ vs. 100 %), bei den vorinkubierten auf $94,37 \pm 3,04$ %, wobei letzterer Wert nicht signifikant von 100 % verschieden ist. Voneinander sind die Werte ebenfalls nicht signifikant verschieden. Andere Autoren haben aus ähnlichen Ergebnissen einen Effekt interpretiert (130): Wenn der Wert ohne Vorbehandlung von 100 % verschieden ist und mit Vorbehandlung nicht, könnte man dies als zilienprotektive Wirkung des Losartans bewerten. In Kombination mit den stark schwankenden Messwerten – einige Versuche mussten auch ganz aus der Auswertung gestrichen werden, weil die Zilien plötzlich irreversibel aufhörten zu schlagen – und dem etwas willkürlichen Auswertemodus erscheint diese These jedoch zu weit hergeholt.

4.9 Versuche zum NO-Einfluss auf die Tracheakontraktion

Zur Überprüfung der Beteiligung von ADMA an der Kontraktion glatter Tracheamusculatur wurden an isolierten Trachearingen von Wistar-Ratten im Organbad Dosis-Wirkungskurven von Carbachol aufgenommen. Bei einem Teil der Versuche wurde das Organ vor Zugabe des Carbachols 30 min mit 1 mM ADMA vorinkubiert.

Aus Abbildung 4.31 geht hervor, dass die Dosis-Wirkungskurve von Carbachol nicht durch die vorherige Inkubation mit 1 mM ADMA beeinflusst wird. Auch ein kontrahierender Eigeneffekt von ADMA auf die nicht mit Carbachol behandelte Trachea konnte nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Da L-Arginin das Substrat der NO-Synthase ist, könnte ein vermehrtes Angebot an L-Arginin bei ausreichendem Vorhandensein des Enzyms zu einer vermehrten NO-Produktion und somit zu einer relaxierenden Wirkung führen. Daher wurde der Einfluss einer Vorinkubation mit L-Arginin (10 mM für 30 min) auf die Carbachol-Kurve getestet. Hätte sich hier eine Rechtsverschiebung gezeigt, hätte man in weiteren Tests untersuchen können, ob diese Verschiebung durch den kompetitiven L-Arginin-Inhibitor ADMA wieder aufgehoben werden kann. Die Vorbehandlung des Organs mit L-Arginin zeigte jedoch keine Auswirkungen auf die Kurve, wie Abb. 4.32 zeigt.

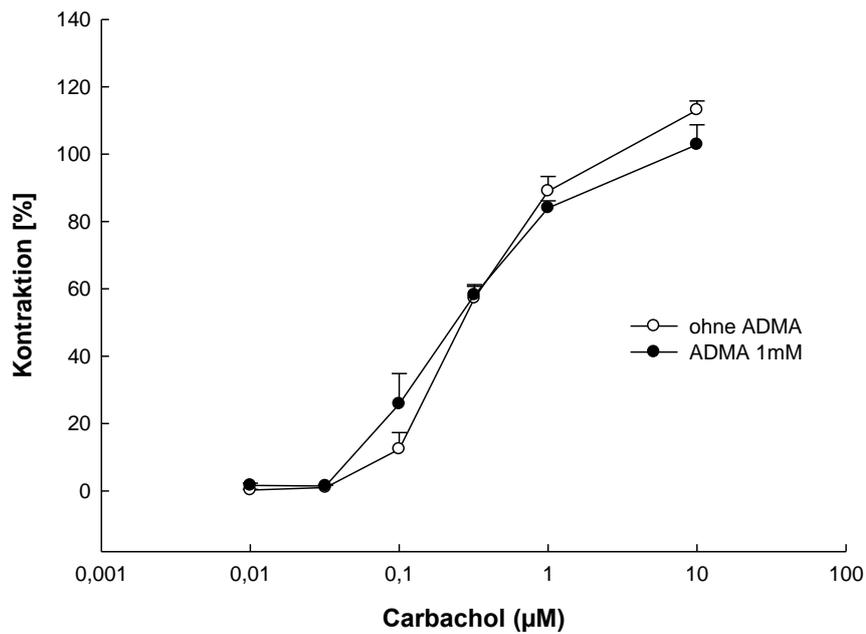


Abbildung 4.31: Einfluss von ADMA auf die Dosis-Wirkungskurve von Carbachol an der isolierten Rattentrachea

Das Organ wurde für 30 min mit ADMA vorinkubiert; anschließend wurde Carbachol in aufsteigenden Konzentrationen kumulativ zugegeben und die Kontraktion der Trachea aufgezeichnet. $n = 4-5$. Die Werte sind dargestellt als % der Kontraktion, die $3,2 \mu\text{M}$ Carbachol am selben Tracheastück auslöst.

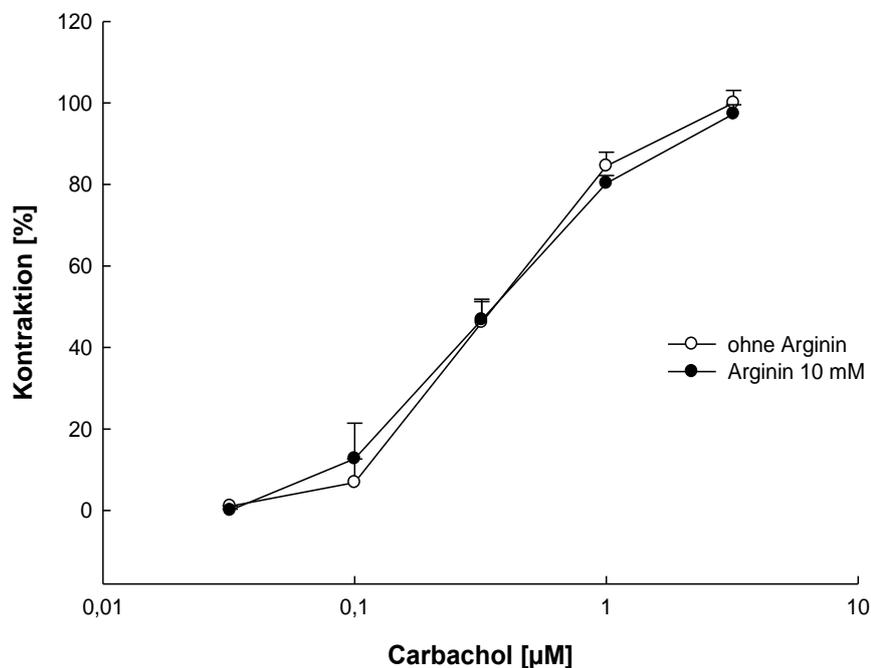


Abbildung 4.32: Einfluss von L-Arginin auf die Dosis-Wirkungskurve von Carbachol an der isolierten Rattentrachea

Das Organ wurde für 30 min mit Arginin vorinkubiert; anschließend wurde Carbachol in aufsteigenden Konzentrationen kumulativ zugegeben und die Kontraktion der Trachea aufgezeichnet. $n = 4-5$. Die Werte sind dargestellt als % der Kontraktion, die $3,2 \mu\text{M}$ Carbachol am selben Tracheastück auslöst.

Möglicherweise kann trotz des erhöhten Angebots an L-Arginin nicht mehr NO gebildet werden, weil die Verfügbarkeit des Enzyms den begrenzenden Faktor darstellt. Als Induktor der NO-Synthase wurde 7,8-Diacetoxy-4-methylcumarin (DAMC) von Arora *et al.* beschrieben (167) und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Substanz führte jedoch in den durchgeführten Experimenten nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen, da sie nur in DMSO löslich ist und dieses einen starken Eigeneffekt auf die Tracheamusculatur ausübt.

Um zu überprüfen, ob die Tracheamusculatur überhaupt auf eine Veränderung des NO-Angebots reagiert, wurden Versuche mit SIN-1 durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen Metaboliten des therapeutisch eingesetzten NO-Donators Molsidomin. Beide Substanzen setzen nicht-enzymatisch NO frei. Da die NO-Synthase hier also keine Rolle spielt, ist das Modell nicht geeignet, Effekte des NOS-Inhibitors ADMA auf dieser Ebene zu überprüfen, sondern nur die allgemeine Interaktion mit einem veränderten NO-Angebot.

Aus Abbildung 4.33 geht hervor, dass eine 30-minütige Vorinkubation mit SIN-1 die anschließende Kontraktion mit 3,2 μM Carbachol geringfügig je nach Konzentration auf 91 bis 94 % senkt. Grundsätzlich reagiert das Organ also auf ein verändertes NO-Angebot.

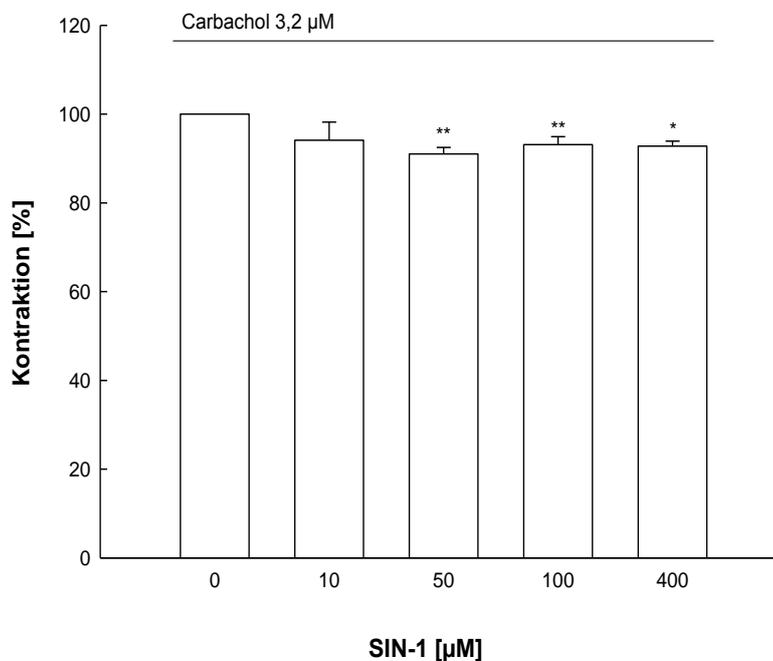


Abbildung 4.33: Einfluss von SIN-1 auf die Carbachol-Kontraktion

Gemessen wurde die Kontraktion nach 3,2 μM Carbachol mit und ohne 30-minütige Vorinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von SIN-1. $n = 3-5$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ gegen die nicht vorinkubierte Kontrolle.

5 Diskussion

5.1 Der CD14-Rezeptor auf BEAS-2B-Zellen

5.1.1 Nachweis der Existenz von CD14

Infektionen mit gramnegativen Bakterien führen auch heute noch zu zahlreichen Todesfällen. Die Lipopolysaccharide der Bakterienzellwände sind starke Endotoxine und können eine überschießende Reaktion des Immunsystems hervorrufen, was zu einer schweren Sepsis und im schlimmsten Fall zum Tod führen kann. Im Normalfall ist jedoch eine Reaktion der Körperzellen auf Lipopolysaccharide lebenswichtig, um eine Immunantwort des Organismus und somit eine Bekämpfung der eingedrungenen Pathogene zu ermöglichen.

Um auf Lipopolysaccharide und andere Pathogene reagieren zu können, benötigen die Körperzellen spezielle Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Diese haben sich im Laufe der Evolution als sogenannte Mustererkennungsrezeptoren herausgebildet und sprechen auf häufig wiederkehrende Muster auf der Oberfläche verschiedener Pathogene an, woraufhin intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt werden. Diese führen letztlich zu einer Immunreaktion der Zelle.

Wie in der Einleitung ausführlich dargestellt, ist das Oberflächenantigen CD14 ein solcher Mustererkennungsrezeptor und somit ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität. In der vorliegenden Arbeit wurde neben der löslichen Form (sCD14) auch die membranständige Form des Antigens nachgewiesen, wobei das Ergebnis der Durchflusszytometrie durch einen Dot Blot bestätigt werden konnte.

Bisher wurden CD14-Rezeptoren beim Menschen neben myeloiden Zellen nur auf Darmepithel- und Gefäßendothelzellen gefunden (37, 53). Die hier nachgewiesene Existenz von CD14 auf BEAS-2B-Zellen wirft ein neues Licht auf die immunologische Aktivität des Bronchialepithels. Dass dieses nicht nur als mechanische Barriere fungiert, sondern darüber hinaus durch die Bildung von Zytokinen und Chemokinen zur immunologischen Erregerabwehr beiträgt, ist bekannt. Es wurde jedoch bisher angenommen, dass eine Reaktion z. B. auf LPS nur erfolgen kann, wenn andere Zellen beteiligt sind; wenn beispielsweise Monozyten lösliches CD14 abspalten, das dann an die Oberfläche der Bronchialepithelzellen andockt und so eine Aktivierung der Zelle ermöglicht. Durch so einen vorgeschalteten Vorgang muss es unweigerlich zu einer Zeitverzögerung kommen – eine schnellere und direktere Reaktion ist möglich, wenn die Bronchialepithelzellen selbst über derartige Mechanismen verfügen. Für eine

effiziente Immunabwehr ist es von entscheidender Bedeutung, dass die Reaktion auf den Erreger unverzüglich in Gang gesetzt wird, um ihn möglichst unschädlich zu machen, bevor er in tieferes Gewebe eindringt. Der Beitrag des Bronchialepithels zur angeborenen Immunität scheint also größer zu sein als bislang angenommen. Da die BEAS-2B-Zellen nicht nur membranständiges CD14 exprimieren, sondern auch die lösliche Form in den Überstand abgeben, können sie auch anderen, CD14-defizienten Zellen in ihrer Umgebung eine Reaktion auf LPS ermöglichen, was die Immunantwort weiter verstärkt.

Durch Inkubation mit LPS konnte keine Heraufregulierung von membranständigem oder löslichem CD14 erreicht werden. Fearn's *et al.* untersuchten die CD14-Genexpression an Mäusen, denen intraperitoneal LPS verabreicht wurde. Sowohl die Plasmaspiegel als auch die CD14-mRNA in zahlreichen untersuchten Geweben, z. B. der Lunge als Gesamtorgan, erhöhten sich durch die LPS-Behandlung. Eine genauere Betrachtung der verschiedenen Zellsysteme zeigte jedoch, dass Bronchiolarepithelzellen zwar basal geringe Mengen an CD14-mRNA enthalten, diese jedoch anders als in Epithelzellen aus z. B. Leber und Niere nicht durch LPS-Injektion steigen (168). Der beobachtete CD14-Anstieg in der Lunge muss also durch andere Zellarten zustande kommen, z. B. durch myeloiden Zellen. Die Regulation der CD14-Expression durch Kontakt mit LPS ist komplex und scheint von Zelltyp zu Zelltyp zu variieren.

Bei all diesen Überlegungen muss man im Auge behalten, dass es sich bei BEAS-2B-Zellen lediglich um eine künstlich erschaffene Zelllinie handelt. Sie besitzt zwar noch vielfältige Eigenschaften normaler Bronchialepithelzellen; es kann allerdings keine Aussage darüber gemacht werden, ob auch Primärzellen den CD14-Rezeptor aufweisen.

Auch kann durch die bloße Anwesenheit des Rezeptors nicht auf seine Funktionalität geschlossen werden. Obwohl serumfreies Medium verwendet wurde, das eigentlich kein lösliches CD14 enthält, kann es sich dennoch um ein Artefakt handeln. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass das Antigen zwar existiert, aber auf Grund fehlender Verbindung ins Zellinnere keine Signalkaskade in Gang setzt. Zwar haben Mayer *et al.* die Existenz des nachgeschalteten TLR4-Proteins in BEAS-2B-Zellen festgestellt (64); allerdings wurde bisher nicht gezeigt, dass der LPS-CD14-TLR4-Signalweg im Bronchialepithel genauso verläuft wie in myeloiden Zellen.

Methodenkritik zum Dot Blot

Als alleiniges Verfahren zum Nachweis eines gesuchten Proteins ist der Dot Blot nicht geeignet. Man kann nicht sicher ausschließen, dass der Primärantikörper sich unspezifisch an ein anderes Protein als CD14 bindet und somit ein falsch positives Ergebnis anzeigt. Daher wird beim Western Blot das Proteingemisch aus dem Zelllysat zunächst mit einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach der Größe der Proteine aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit der auch im Dot Blot verwendeten Doppelantikörpermethode detektiert. Eine Schwärzung des Röntgenfilms gilt hierbei nur dann als positives Signal, wenn sie an der Stelle auftritt, die dem Molekulargewicht des gesuchten Proteins entspricht. Da in diesem Fall nur eine Bestätigung des eigentlich bereits bekannten Ergebnisses gesucht wurde, reichte der Dot Blot als zeitsparende Alternative für diese Zwecke aus. Bei den beiden Verfahren (Dot Blot und FACS) wurden unterschiedliche Antikörpertypen verschiedener Hersteller verwendet, was zu einer weiteren Absicherung des Ergebnisses beiträgt.

5.1.2 Untersuchung der Funktionalität des CD14-Rezeptors

In Anwesenheit eines monoklonalen CD14-Antikörpers des Subtyps 18D11 wird nach LPS-Stimulation weniger Interleukin-8 ausgeschüttet als in der Kontrolle. Dies deutet darauf hin, dass der CD14-Rezeptor am untersuchten Signalweg beteiligt ist. Der Subtyp MEM15 zeigt einen deutlich schwächeren Effekt als 18D11. Dieses Phänomen wurde auch von anderen Autoren beschrieben; so testeten Jersmann *et al.* fünf verschiedene Antikörper für den CD14-Nachweis auf HUVEC-Zellen, die alle stark unterschiedliche Ergebnisse lieferten (37). Nicht optimale Versuchsbedingungen können also unter Umständen falsch negative Ergebnisse zur Folge haben.

Zwar ist kritisch anzumerken, dass eine verminderte IL-8-Produktion in Anwesenheit des Antikörpers nur bei einer LPS-Konzentration (1 µg/ml) statistisch signifikant war. Dennoch liegt die Vermutung nahe, dass die beobachtete IL-8-Ausschüttung nach LPS-Stimulation über einen Mechanismus vermittelt wird, an dem CD14 beteiligt ist.

5.2 Reaktion der BEAS-2B-Zellen auf LPS

5.2.1 Veränderung der Proliferation

Die Inkubation mit Lipopolysacchariden von *Pseudomonas aeruginosa* führt an BEAS-2B-Zellen zu einer gesteigerten Proliferation. Bei einer Konzentration von 10 µg/ml LPS ist die Proliferation nach 48-stündiger Inkubation etwa auf das Doppelte des Kontrollwerts erhöht. Eine vermehrte Proliferation des Bronchialepithels führt zu Atemwegsobstruktionen, die durch den erhöhten Widerstand die Atmung erschweren. Cohen *et al.* stellten fest, dass das Atemwegsepithelgewebe von Asthmatikern im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen verdickt ist, und fanden weitere Hinweise auf eine erhöhte Proliferation (169). Die Gruppe von Ricciardolo fand eine Proliferationssteigerung des Atemwegepithels bei atopischen Asthmatikern, nachdem diese mit Allergenen in Kontakt gekommen waren (170). Das sogenannte Atemwegs-Remodeling infolge einer veränderten Proliferation von Epithelzellen, glatten Muskelzellen u. a. ist ein wichtiger Aspekt der entzündlichen Prozesse, die im Verlauf einer Asthma-Erkrankung auftreten, da es sowohl zu einer Verengung der Atemwege als auch zu einem Funktionsverlust des Lungengewebes führen kann.

Bisherige Untersuchungen zur Proliferation unter LPS-Einfluss sind widersprüchlich (171-173). Die hier vorgestellten Ergebnisse decken sich nicht mit denen von Freitag *et al.*, die an Epithelzellen der Rattentrachea eine verminderte Proliferation nach Inkubation mit LPS beschrieben haben (171). Dies könnte durch die unterschiedlichen untersuchten Spezies sowie durch verschiedenartiges LPS zu erklären sein. Nichtsdestotrotz gibt es in der Literatur auch Berichte über eine gesteigerte Proliferation nach Kontakt mit LPS (z.B. (172, 173)).

Zur Untersuchung der Signalwege, die zu der beobachteten erhöhten Proliferation nach LPS-Stimulation führen, wurden dem Reaktionsgemisch Inhibitoren von MAPK-Kaskaden (PD 98059, SB 202190 und SP 600125), Tyrosinkinase (Genistein) und PI3-Kinasen (LY 294002) zugesetzt; dadurch war der Effekt des LPS zum Teil wieder aufgehoben. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass p38- und JNK-MAPK, Tyrosinkinase und PI3-Kinasen am zugrundeliegenden Signalweg beteiligt sind. Da der ERK 1/2-Inhibitor PD 98059 nicht zu einer Abschwächung der LPS-Wirkung führte, scheint dieser Teil des MAPK-Wegs nicht zu der erhöhten Proliferation beizutragen, obwohl auch ERK 1 und 2 durch Inkubation mit LPS heraufreguliert werden – wenn auch schwächer als die anderen MAPK (siehe Kapitel 4.4). An anderen Zellsystemen sind ERK 1 und 2 durchaus an der LPS-induzierten Proliferation beteiligt, z. B. an glatten Muskelzellen aus der Rindertrachea (174) oder an humanen Cholangiozyten

(175). Für BEAS-2B-Zellen ist über diesen Sachverhalt bisher nichts beschrieben, allerdings trägt ERK 1/2 hier zur Proliferation bei, wenn nicht LPS, sondern der hepatische Wachstumsfaktor (HGF) als Stimulus verwendet wird (176). Dagegen hat unter diesen Bedingungen der p38-Inhibitor keinen Effekt: Unterschiedliche Beteiligungen der verschiedenen MAPK-Untergruppen scheinen also durchaus vorzukommen.

Angeregt durch die Arbeit von Chen *et al.* wurde des Weiteren untersucht, welche Auswirkungen der Tyrosinkinaseinhibitor Genistein auf die Proliferation von unstimulierten BEAS-2B-Zellen hat, d. h. in Abwesenheit von LPS.

Genistein ist ein Isoflavon mit partiellen, sowohl agonistischen als auch antagonistischen estrogenen Eigenschaften. In Säuglingsnahrung auf Sojabasis sind bis zu 47 mg/l Isoflavone enthalten, wobei Genistein und sein Glucosid Genistin über 65 % ausmachen. Daher kommt das Darmepithel von mit Sojaprodukten ernährten Kleinkindern mit hohen Genisteinkonzentrationen in Kontakt. Chen *et al.* stellten fest, dass die Proliferation von Caco2BBE-Zellen (einer humanen Darmepithelzelllinie) bei Kontakt mit geringen Genisteinkonzentrationen (1 µg/ml) erhöht ist, wohingegen hohe Konzentrationen (30 µg/ml) eine Proliferationshemmung bewirkten (156).

Ähnliche Ergebnisse mit vergleichbaren Konzentrationen wurden auch für BEAS-2B-Zellen gefunden: Während die Proliferation nach 48-stündiger Inkubation mit 10 µM Genistein nahezu unverändert gegenüber der Kontrolle war, stieg sie bei 1 µM auf ca. 140 % an, wurde bei 100 µM jedoch auf etwa 10 % gesenkt. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu untersuchen, ob der Genistein-Effekt über Estrogenrezeptoren vermittelt wird, wie es an den von Chen *et al.* untersuchten Darmepithelzellen der Fall war. Die Estrogenrezeptoren ER α und ER β wurden auf BEAS-2B-Zellen bereits nachgewiesen (177). Frauen haben epidemiologischen Studien zufolge ein größeres Risiko, als Folge des Rauchens an Lungenkrebs zu erkranken als Männer. Dies könnte mit Sexualhormonen zusammenhängen; z. B. ist bei postmenopausalen Frauen die Wahrscheinlichkeit für Lungenkrebs unter einer Estrogensersatztherapie erhöht (178). Mollerup *et al.* konnten an unstimulierten BEAS-2B-Zellen zeigen, dass die Proliferation der Zellen in Anwesenheit des selektiven Estrogenrezeptormodulators Tamoxifen reduziert und in Anwesenheit von 17 β -Estradiol leicht erhöht ist (177). Eine erhöhte Proliferation spielt bei der Carcinogenese eine wichtige Rolle. Sexualhormone könnten also nicht nur bei bekannten hormonabhängig wachsenden Tumoren wie Mamma- oder Prostata-CA, sondern auch bei Lungenkrebs von Bedeutung sein.

5.2.2 Aktivierung von MAP-Kinasen

Mit dem Proteome Profiler® der Firma R&D Systems kann die Menge phosphorylierter MAPK in lysierten Zellen gemessen werden. Dabei zeigte sich, dass BEAS-2B-Zellen mehr phosphorylierte und damit aktivierte MAPK enthalten, wenn sie für 24 h mit 10 µg/ml LPS stimuliert werden. Besonders deutlich ist der Effekt bei den verschiedenen Formen der p38-MAPK, während ERK 1 und 2 nur geringfügig erhöht sind. Versuche mit geringeren LPS-Konzentrationen wurden nicht durchgeführt. Da jedoch der in Kapitel 4.6.3.1 beschriebene Einsatz verschiedener MAPK-Inhibitoren auch schon bei weniger LPS zu Hemmeffekten bezüglich der IL-8-Ausschüttung führte, kann davon ausgegangen werden, dass die MAPK auch in niedrigeren Konzentrationsbereichen bereits heraufreguliert werden.

Dass MAPK durch LPS aktiviert werden, ist für andere Zellsysteme ausführlich beschrieben worden, z. B. für humane Monozyten (63). Für BEAS-2B-Zellen finden sich zwar Berichte über eine Beteiligung von MAPK an einer Zytokinausschüttung, die beispielsweise durch Allergene aus Hausstaubmilben (179) oder durch Feinstaubpartikel (180) hervorgerufen wurde. Es fehlten jedoch bisher Arbeiten über LPS-induzierte Heraufregulierung von MAPK in BEAS-2B-Zellen.

MAPK sind lediglich Zwischenprodukte in der intrazellulären Signalkaskade. Die Feststellung, dass sie als Reaktion auf einen Stimulus vermehrt phosphoryliert und damit aktiviert werden, sagt zunächst noch nichts darüber aus, ob der Stimulus auch zu einem messbaren Effekt führt, z. B. der vermehrten Sekretion von Zytokinen. Der Signalweg könnte durch verschiedene inhibitorische Faktoren noch gestoppt werden, bevor es zu außerhalb der Zelle sichtbaren Folgen kommt. Daher muss im Anschluss ein messbarer LPS-Effekt unter der Fragestellung untersucht werden, ob die Anwesenheit von Inhibitoren der MAPK zu einer Abschwächung des Effekts führt.

Methodenkritik

Der Proteome Profiler® ermöglicht zwar die Bestimmung der Menge an phosphorylierten Kinasen, erlaubt jedoch keine Aussage über den Aktivierungsstatus von MAPK in der Zelle insgesamt. Dazu müsste man sowohl den Gehalt an unphosphorylierter als auch an phosphorylierter Form bestimmen und diese zueinander ins Verhältnis setzen. Problematisch ist bei dieser Methode außerdem, dass die Schwärzung des Röntgenfilms nicht linear ist und eine Sättigung erreicht, wenn die Entwicklungszeit zu lang gewählt wird. Unterschiede in der Farbintensität der einzelnen Punkte können dann densitometrisch nicht mehr sicher bestimmt werden.

Diese Schwierigkeit tritt jedoch bei allen Methoden auf, die auf einer mittels Röntgenfilm detektierten Chemilumineszenz beruhen (z. B. Western Blot).

Die verwendete Methode liefert somit höchstens semiquantitative Ergebnisse. Dennoch bietet sie eine gute Möglichkeit, mit relativ geringem Aufwand verschiedene Kinasen daraufhin zu untersuchen, ob ihre Menge durch einen bestimmten Stimulus verändert wird. Die Alternative hierzu wäre nämlich, sämtliche fragliche Proteine einzeln mit Hilfe von Western Blots stimulierter und unstimulierter Zellen nachzuweisen, wofür jeweils die spezifischen Antikörper eingesetzt werden müssten. Die Aussagekraft eines solchen Vorgehens wäre allerdings kaum größer, da diese Methode auf einem ähnlichen Messprinzip beruht wie das hier eingesetzte Screening.

5.2.3 Aktivierung von NFκB

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB bildet den Abschluss zahlreicher intrazellulärer Signalkaskaden, die im Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen stehen. Die inaktive Form wird im Zytoplasma durch IκB gebunden; bei einer Phosphorylierung dieses inhibitorischen Proteins wird NFκB freigesetzt und kann in den Zellkern transloziert werden, wo es u. a. die Expression verschiedener proinflammatorischer Gene induziert.

Die Untersuchung der Kernextrakte von mit LPS stimulierten BEAS-2B-Zellen hat gezeigt, dass NFκB durch eine solche Behandlung heraufreguliert wird. Dadurch werden u. a. solche Gene vermehrt transkribiert, die für proinflammatorische Zytokine wie IL-8 codieren. Ob dieser zu erwartene Zusammenhang auch an BEAS-2B-Zellen besteht, wurde durch die in Kapitel 4.6.5 beschriebenen Versuche mit dem NFκB-Inhibitor SN50 untersucht.

Soweit nicht ausdrücklich erwähnt, wurden im Rahmen dieser Arbeit Lipopolysaccharide der Spezies *Pseudomonas aeruginosa*, Serotyp 10, verwendet. LPS ist keine einheitliche, definierte Substanz, sondern die exakte Zusammensetzung variiert von Spezies zu Spezies. Die unterschiedlichen Zuckerreste im sogenannten O-Antigen sind charakteristisch für einzelne Bakterienarten und können zur Differenzierung derselben herangezogen werden. Doch auch die Struktur des toxischen Prinzips, des Lipids A, ist bei den einzelnen Arten im Hinblick auf die Anzahl, Kettenlänge und Lokalisation der Fettsäuren unterschiedlich. So wird dem LPS aus *P. aeruginosa* allgemein eine geringere Toxizität zugeschrieben als beispielsweise dem *E. coli*-LPS (182).

Der Vergleich der beiden LPS-Typen im Hinblick auf die Aktivierung von NFκB zeigt, dass *E. coli*-LPS bereits in Konzentrationen zu einem NFκB-Anstieg führt, die bei

P. aeruginosa noch keinerlei Wirkung haben. BEAS-2B-Zellen reagieren also in diesem Modell wesentlich empfindlicher auf Lipopolysaccharide von *E. coli*.

5.2.4 Sekretion von RANTES und TNF α

Eine Stimulation der BEAS-2B-Zellen mit LPS führte nicht zu einer messbaren Sekretion von TNF α . Wie in Kapitel 5.3.1 beschrieben, ist allerdings nicht gesichert, ob die hier verwendeten Zellen überhaupt zur Bildung von TNF α fähig sind.

Im Gegensatz dazu führte die LPS-Inkubation über 24 h zu einer erhöhten Sekretion von RANTES. Dabei konnte jedoch nur mit der höchsten LPS-Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ ein statistisch signifikanter Anstieg erzielt werden, der auch nur ca. 11 % des Effekts der Positivkontrolle aus TNF α und IFN γ betrug. Anders als IL-8 wird die RANTES-Sekretion also nur sehr schwach gesteigert.

RANTES ist ein proinflammatorisches, chemotaktisches Zytokin, das u. a. mit entzündlichen Erkrankungen der Atemwege in Verbindung gebracht wird. Zietkowski *et al.* konnten zeigen, dass bei Patienten mit allergischem Asthma die Plasmakonzentration von RANTES im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht ist und sich nach körperlicher Anstrengung weiter steigert (181). Daraus schließen die Autoren, dass RANTES bei Asthmatikern an der verstärkten Entzündungsreaktion im Anschluss an körperliche Belastung beteiligt sein könnte.

5.2.5 Sekretion von IL-8

In der vorliegenden Arbeit wurde die Konzentration des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-8 in Zellüberständen gemessen, um die entzündungsfördernden Eigenschaften von Lipopolysacchariden zu untersuchen. Die Inkubation der BEAS-2B-Zellen mit LPS über 6 bis 48 h zeigte eine sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängige Steigerung der IL-8-Sekretion. Bei der höchsten eingesetzten LPS-Konzentration (10 $\mu\text{g/ml}$) wurden Werte erreicht, die denen der Positivkontrolle aus je 5 ng/ml TNF α und IFN γ entsprachen. In Bezug auf IL-8 ist die Reaktion der Zellen auf LPS also wesentlich stärker ausgeprägt als beispielsweise beim oben beschriebenen RANTES.

Die IL-8-Konzentrationen wurden in den beschriebenen Versuchen jeweils absolut gemessen und nicht z. B. auf den Gesamtproteingehalt der Probe bezogen, da sich auch ohne eine solche Umrechnung reproduzierbare Ergebnisse erzielen ließen. Im Zusammenspiel mit der beobachteten Proliferationssteigerung nach LPS-Inkubation könnte man nun vermuten, dass die vermehrte IL-8-Sekretion daher resultiert, dass

mehr Zellen vorhanden sind und diese natürlich mehr Zytokine produzieren können. Eine genaue Betrachtung der Werte zeigt jedoch, dass die Proliferation bei 10 µg/ml lediglich auf 200 % gesteigert ist, die IL-8-Ausschüttung aber z. T. auf das 10- bis 20-fache. Der gemessene Effekt kann also nicht allein in der erhöhten Proliferation begründet liegen.

Der Anstieg der IL-8-Sekretion nach Stimulation mit LPS wurde für BEAS-2B-Zellen bereits von Schulz *et al.* beschrieben (52). Allerdings konzentrierten sich diese Autoren eher auf den Einfluss von Serum auf die Dosis-Wirkungskurve des LPS, wobei eine konzentrationsabhängige Linksverschiebung der Kurve festgestellt wurde. Dennoch maßen sie auch in serumfreiem Medium nach 24-stündiger Inkubation mit 10 µg/ml LPS IL-8-Konzentrationen von ca. 2000 pg/ml, was in der Größenordnung den in dieser Arbeit gefundenen Werten entspricht. Schulz *et al.* verwendeten für ihre Versuche LPS von *E. coli*, im Gegensatz zum hier eingesetzten *P. aeruginosa*-LPS.

IL-8 steht in direktem Zusammenhang mit der Entstehung von Asthma und anderen entzündlichen Bronchialerkrankungen, wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben. Die hier gezeigten Ergebnisse bestätigen, dass der Kontakt mit LPS, z. B. durch Einatmen von LPS-haltigen Staubpartikeln, sich proinflammatorisch auf das Bronchialepithel auswirkt. Die chemotaktische Aktivität des IL-8 würde in einem erweiterten Modell, das nicht nur aus Bronchialepithelzellen besteht, eine Einwanderung von Neutrophilen bewirken, die im Zusammenspiel mit weiteren Faktoren das Entzündungsgeschehen aufrechterhalten und verstärken würden.

Die Beeinflussung der IL-8-Konzentration z. B. durch spezifische Antikörper könnte in Zukunft ein interessanter Ansatz für die Behandlung entzündlicher Erkrankungen der Atemwege sein.

5.2.5.1 Vergleich verschiedener Lipopolysaccharide

Um zu überprüfen, inwieweit sich verschiedene LPS-Arten im Hinblick auf die IL-8-Ausschüttung unterscheiden, wurde neben *P. aeruginosa*-LPS auch solches von *E. coli*, Serotyp O55:B5, untersucht. Letzteres verursachte bereits in Konzentrationen von 10 ng/ml einen starken IL-8-Anstieg, während ersteres in diesem Konzentrationsbereich noch kaum Wirkung zeigte. Die Dosis-Wirkungskurve war beim *E. coli*-LPS etwa um den Faktor 1000 nach links verschoben. Diese Daten entsprechen den oben für die Aktivierung von NFκB beschriebenen Ergebnissen.

Eine Studie zum Einfluss verschiedener LPS-Typen auf Lungenzellen wurde von Koyama *et al.* durchgeführt (182). Die Autoren maßen die Erhöhung der chemotaktischen Aktivität auf Neutrophile sowie der Sekretion von IL-8 und G-CSF an der

Alveolarepithelzelllinie A549. Dabei zeigte LPS von *P. aeruginosa* eine wesentlich stärkere Wirkung als verschiedene Serotypen von *E. coli*-LPS. An BEAS-2B-Zellen wurden ähnliche Verhältnisse bezüglich der chemotaktischen Aktivität gefunden; die Stimulation der IL-8-Freisetzung durch unterschiedliche LPS-Typen wurde an diesen Zellen jedoch nicht untersucht. Interessanterweise zeigten einige Serotypen von *E. coli*-LPS in der zitierten Studie gar keine Wirkung auf die untersuchten Parameter. Möglicherweise ist die in Kapitel 5.3.1 beschriebene Tatsache, dass die BEAS-2B-Zellen auf das eingesetzte LPS nicht mit TNF α -Sekretion reagierten, auch darauf zurückzuführen, dass nur eine einzige LPS-Art getestet wurde; andere Typen hätten vielleicht zu einer Reaktion geführt.

Im Gegensatz zu den von Koyama beschriebenen Vorgängen an A549-Zellen zeigte sich für BEAS-2B-Zellen der umgekehrte Fall in Bezug auf die IL-8-Sekretion: LPS von *P. aeruginosa* ist in diesem System weniger potent als jenes von *E. coli*. Dass für die vorliegende Arbeit hauptsächlich *P. aeruginosa*-LPS verwendet wurde, liegt in der bedeutenden Rolle dieses Bakteriums für entzündliche Erkrankungen des Respirationstraktes begründet. So werden z. B. Pneumonien bei Patienten mit Cystischer Fibrose sehr häufig durch *P. aeruginosa* ausgelöst. Außerdem ist *P. aeruginosa* ein weitverbreiteter Krankenhauskeim und für ca. 10 % der nosokomialen Infektionen verantwortlich. Bei Intensivpatienten siedelt er sich häufig im oberen Respirationstrakt an und kann hier zu schwerwiegenden Komplikationen führen. Ca. 3 % der Sepsisfälle sind auf *P. aeruginosa*-Infektionen zurückzuführen, wobei diese Fälle die höchste Letalität aller Sepsisformen aufweisen. Außerhalb des Krankenhauses kommt *P. aeruginosa* vor allem bei Patienten mit Cystischer Fibrose und Bronchiektasien sowie bei urologischen Infektionen vor (183). Infektionen der Atemwege mit *E. coli*-Stämmen beschränken sich hauptsächlich auf Patienten mit endotrachealer Intubation; *E. coli* verursacht weitaus häufiger Harnwegs- oder Darmentzündungen.

5.2.5.2 Beteiligte Signalwege

MAP-Kinasen (ERK1/2, p38 und JNK)

Wie oben beschrieben, konnte bisher gezeigt werden, dass eine Inkubation mit LPS einerseits zur Heraufregulierung verschiedener MAPK und andererseits zu einer verstärkten Sekretion von IL-8 führt. Um einen Kausalzusammenhang zwischen diesen beiden beobachteten Phänomenen herzustellen, wurden die intrazellulären Signalwege untersucht, die zur erhöhten IL-8-Ausschüttung führen.

Der Zusatz spezifischer Inhibitoren der drei MAPK-Wege ERK 1/2, p38 und JNK führte jeweils zu einer verminderten IL-8-Sekretion an mit LPS-stimulierten BEAS-2B-Zellen. Anders als bei p38 und JNK bewirkte der ERK 1/2-Inhibitor PD 98059 nur eine geringe Verschiebung der LPS-Dosis-Wirkungskurve, die nicht statistisch signifikant war. Daraus lässt sich schließen, dass zwar alle drei untersuchten Teilwege an der erhöhten IL-8-Sekretion beteiligt sind, der ERK 1/2-Weg jedoch weniger stark als die beiden anderen. Dies deckt sich mit dem in Kapitel 5.2.2 beschriebenen Ergebnis des Proteome Profilers®; da ERK 1/2 durch LPS schwächer heraufreguliert wird als p38 und JNK, wirkt sich auch die Hemmung dieses Weges weniger stark auf den von LPS hervorgerufenen Effekt, die IL-8-Sekretion, aus.

Die Signalkaskade $LPS \rightarrow MAPK \rightarrow IL-8$, die an anderen Zellsystemen seit langem etabliert ist, wird hier erstmals für BEAS-2B-Zellen beschrieben und trägt zum verbesserten Verständnis der intrazellulären Vorgänge im Bronchialepithel nach Kontakt mit LPS bei.

Tyrosinkinasen

Tyrosinkinasen sind an zahlreichen intrazellulären Signaltransduktionsvorgängen beteiligt. Im Gegensatz zu MAPK verfügen sie auch über extrazelluläre Domänen, sind also in der Lage, Signale von außerhalb der Zelle aufzunehmen und über transmembranäre Strukturen ins Zellinnere weiterzugeben, woraufhin beispielsweise MAP-Kinasen aktiviert werden.

Das Isoflavon Genistein ist ein potenter Tyrosinkinaseinhibitor. Sein hemmender Einfluss auf die LPS-induzierte IL-8-Sekretion an BEAS-2B-Zellen zeigt, dass auch Tyrosinkinasen an der Signalkaskade beteiligt sind, die zur Zytokinausschüttung führt. Allerdings ist Genistein nicht für eine bestimmte Tyrosinkinase spezifisch, sondern hemmt viele dieser Kinasen; welche also genau gehemmt werden, zeigt das Ergebnis nicht. Es sagt auch noch nichts darüber aus, in welchem Verhältnis die Tyrosinkinasen zu den ebenfalls beteiligten MAP-Kinasen stehen, d. h. ob die beiden Kinasetypen sich gegenseitig beeinflussen und z. B. MAPK von Tyrosinkinasen aktiviert werden. Um dies herauszufinden, könnte man den oben beschriebenen Proteome Profiler® einsetzen und überprüfen, ob die MAPK durch LPS schwächer heraufreguliert werden, wenn Genistein anwesend ist. Das wäre ein Hinweis darauf, dass LPS die MAPK-Expression nicht direkt verstärkt, sondern diese zumindest teilweise über eine vorherige Aktivierung von Tyrosinkinasen vermittelt wird.

Im Kapitel 5.2.1 wurde erläutert, dass Genistein die LPS-induzierte Proliferation von BEAS-2B-Zellen hemmt. Man könnte also zu dem Schluss kommen, dass die

verminderte IL-8-Sekretion durch eine geringere Zellzahl verursacht wird. Bei genauer Analyse zeigt sich jedoch, dass 10 μM Genistein die durch 0,1 $\mu\text{g/ml}$ LPS verursachte Proliferationssteigerung nicht verändert, aber bereits einen hemmenden Effekt auf die IL-8-Sekretion ausübt (vgl. Abb. 4.5, 4.6 und 4.19), sodass diese Vermutung nicht haltbar ist.

Lipidkinasen

Die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kinase) gehört zur Gruppe der Lipidkinasen. Anders als die bisher beschriebenen Kinasen phosphoryliert sie also keine Proteine, sondern Lipide, und bewirkt somit eine Veränderung der Struktur und Funktion derselben. Nach weiteren Phosphorylierungsschritten wird letztlich die Proteinkinase B aktiviert, die auch unter dem Namen Akt bekannt ist. Die Beziehung zwischen LPS und dem PI3-Kinase/Akt-Signalweg wurde z. B. für Kolorektalkarzinomzellen beschrieben, an denen eine Behandlung mit LPS zu vermehrter Akt-Phosphorylierung führt (78). An humanen glatten Tracheamuskelzellen werden die durch LPS erhöhte Neutrophilenadhäsion und die Expression von VCAM-1 bei Anwesenheit des PI3-Kinaseinhibitors LY 294002 vermindert (80). In Bezug auf IL-8 wird in einer Studie an Darmepithelzellen beschrieben, dass die LPS-induzierte IL-8-Sekretion durch LY 294002 aufgehoben wird (184). Ähnliches konnte in der vorliegenden Arbeit auch für BEAS-2B-Zellen gezeigt werden: Bis zu einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS wird die IL-8-Ausschüttung durch 25 μM LY 294002 fast auf Kontrollniveau reduziert, und auch bei 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS bewirkt der PI3-Kinasehemmer eine Effektabschwächung um mehr als 50 %.

Neben den oben beschriebenen Proteinkinasen sind also auch Lipidkinasen an der beobachteten Chemokinausschüttung beteiligt. Diese Signalkaskade kann wiederum in die Aktivierung von MAPK münden, wobei ähnlich wie bei den Tyrosinkinasen nicht festgestellt werden kann, in welcher Reihenfolge die verschiedenen Phosphorylierungsschritte in diesem Modell ablaufen.

IRAK

Auf die Bindung von LPS an den TLR4/CD14-Komplex folgt, vermittelt durch das nachgeschaltete Protein MyD88, die Aktivierung der IRAK (*Interleukin-1-receptor associated kinase*). Diese intrazelluläre Kinase ist in BEAS-2B-Zellen ebenfalls an der LPS-induzierten IL-8-Sekretion beteiligt, da die Anwesenheit eines spezifischen IRAK-1/4-Inhibitors zu einem verringerten IL-8-Gehalt im Zellüberstand führt. Die IRAK ist

ein vielseitiges intrazelluläres Bindeglied zwischen TLR4/CD14, dem PI3K/Akt-Weg und der MAPK-Kaskade.

NFκB

Die Beeinflussung des NFκB-Weges durch LPS wurde in der vorliegenden Arbeit auf zwei Arten untersucht. Der direkte Nachweis von durch LPS aktiviertem NFκB wird in Kapitel 5.2.3 beschrieben; ob diese Aktivierung allerdings auch für die vermehrte IL-8-Ausschüttung verantwortlich ist, kann hieraus noch nicht geschlossen werden. Zur Untersuchung des Signalwegs wurde das membrangängige Peptid SN 50 als Inhibitor im IL-8-ELISA eingesetzt. Dieses hemmt die Translokation von NFκB in den Zellkern. Die verminderte IL-8-Sekretion bei Zusatz von SN 50 beweist also, dass NFκB zumindest teilweise zum untersuchten Signalweg beiträgt.

Feedback-Mechanismus über den IL-8-Rezeptor

Die Zytokinausschüttung einer Zelle wird häufig über Feedback-Mechanismen reguliert, die durch auf der Zelloberfläche befindliche Rezeptoren für das entsprechende Zytokin ermöglicht werden. Dabei kann ein Zytokin seine eigene Freisetzung entweder fördern, um die Reaktion der Zelle auf einen bestimmten Stimulus zu erhöhen, oder sie hemmen, um eine überschießende Immunantwort zu vermeiden. Solche Feedback-Schleifen stellen einen wichtigen Mechanismus der immunologischen Homöostase dar.

Ob BEAS-2B-Zellen über Rezeptoren für IL-8 (CXCR 1 und 2) verfügen, ist nicht bekannt und wurde auch im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Allerdings konnte gezeigt werden, dass SB 225002, ein Antagonist am CXCR2-Rezeptor, in bestimmten niedrigen LPS-Konzentrationsbereichen die IL-8-Sekretion leicht erhöht. Dies deutet auf einen negativen Feedback-Mechanismus hin: IL-8 hemmt seine eigene Freisetzung über den CXCR2-Rezeptor; wenn dieser durch den Antagonisten blockiert ist, fällt die Hemmung weg und die IL-8-Ausschüttung steigt. Bei höheren LPS-Konzentrationen gleichen die Kurven sich wieder an. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass bei diesen Proben durch den höheren LPS-Gehalt soviel IL-8 sezerniert wird, dass der Antagonist wieder vom Rezeptor verdrängt und der Effekt aufgehoben wird.

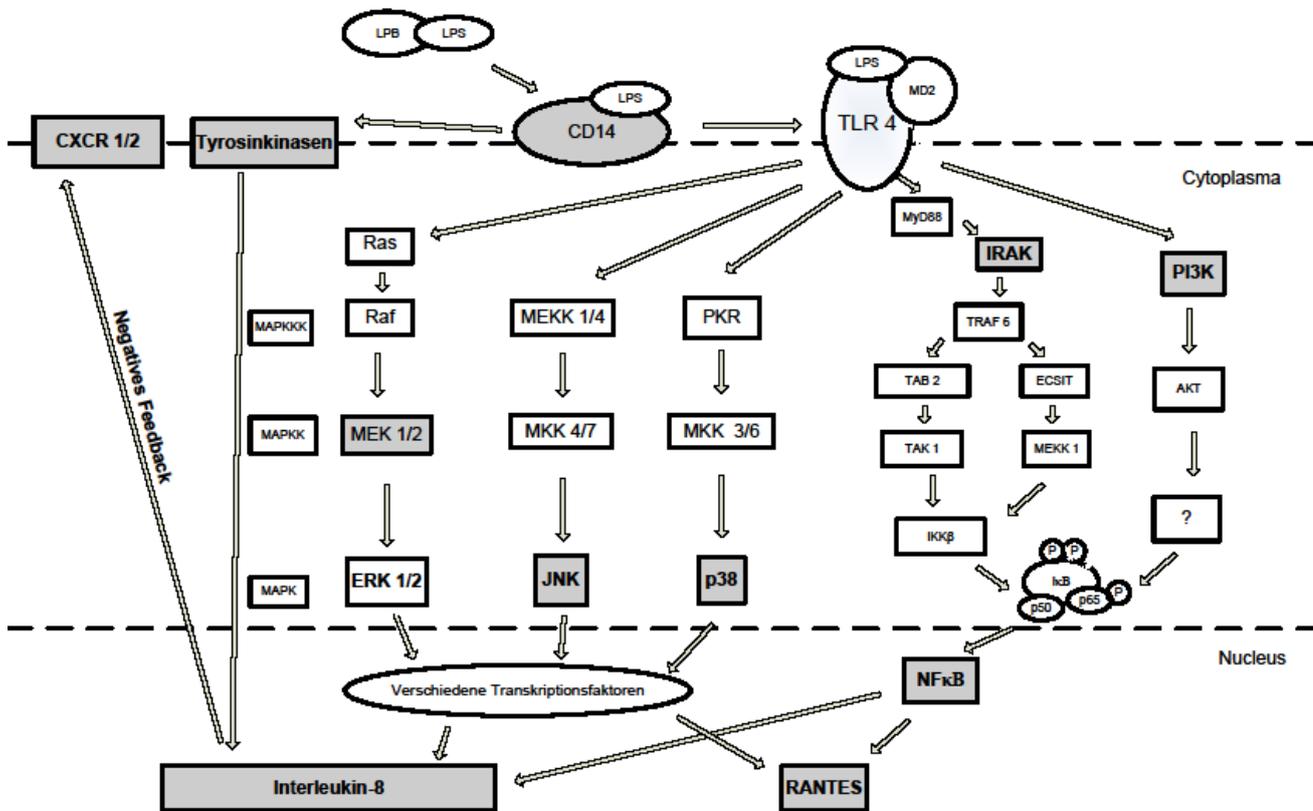


Abbildung 5.1: Zusammenfassung: Mögliche Signalwege in BEAS-2B-Zellen, modifiziert nach (63)

Die in dieser Arbeit untersuchten Bestandteile des Signalwegs sind grau hinterlegt.

Reaktive Sauerstoffspezies

Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine direkten Messungen Reaktiver Sauerstoffspezies nach einer LPS-Inkubation durchgeführt. Stattdessen sollte mit einer indirekten Methode unter Einsatz des SOD-Mimetikums Tempol eine Beteiligung von ROS an der IL-8-Ausschüttung nachgewiesen werden. Dies gelang jedoch nicht; die Anwesenheit von Tempol hatte an BEAS-2B-Zellen keine Auswirkung auf die Konzentration des Chemokins im Zellüberstand. Bhattacharyya *et al.* hatten dagegen bei ähnlichen Versuchen an Kolonepithelzellen einen hemmenden Effekt des Tempols und damit eine Beteiligung von ROS am Signalweg, der zur IL-8-Ausschüttung führt, zeigen können (160). Es wurde allerdings in der Literatur bisher auch noch nicht beschrieben, inwiefern BEAS-2B-Zellen auf LPS-Inkubation mit der Bildung von Sauerstoffradikalen reagieren. Bei Kontakt mit anderen Stimuli, z. B. Titandioxid-Nanopartikeln, werden jedoch vermehrt ROS produziert (185). BEAS-2B-Zellen sind

also grundsätzlich zur ROS-Bildung in der Lage, auch wenn hier nicht gezeigt werden konnte, dass diese zur LPS-induzierten IL-8-Sekretion beiträgt.

5.2.5.3 Co-Kultivierung von BEAS-2B- und U937-Zellen

Bei der Abwehr von Krankheitserregern arbeiten die verschiedenen Zelltypen selten allein, sondern treten miteinander in vielfältige Wechselwirkungen. Die Gruppe von Drumm *et al.* konnte z. B. zeigen, dass Bronchialepithelzellen in Anwesenheit von Monozyten mehr IL-6 und IL-8 als Reaktion auf Feinstaubpartikel produzieren als in Monokultur (162). Daher wurden in dieser Arbeit auch Co-Kultur-Experimente mit BEAS-2B-Zellen und der Monozyten-Vorläuferzelllinie U937 durchgeführt, um die gegenseitige Beeinflussung im Hinblick auf eine Immunreaktion zu untersuchen. Bei der ersten Versuchsvariante, bei der konfluent gewachsene BEAS-2B-Zellen in Anwesenheit einer U937-Zellsuspension mit LPS inkubiert wurden, zeigte sich im Hinblick auf die IL-8-Sekretion keine Differenz zur Monokultur. Die Unterschiede gegenüber den Ergebnissen von Drumm *et al.* lassen sich einerseits durch die verschiedenen Stimuli – LPS bzw. Feinstaubpartikel –, andererseits durch die Tatsache erklären, dass hier im Gegensatz zu der früheren Arbeit keine frisch isolierten Blutmonozyten, sondern unvollständig differenzierte Vorläuferzellen verwendet wurden.

Die zweite Versuchsanordnung bestand darin, dass die U937-Zellen in Medium kultiviert wurden, das zuvor auf BEAS-2B-Zellen gestanden hatte (*epithelial cell conditioned medium* = ECCM). Hierbei kommt also kein direkter Kontakt zwischen den beiden Zelltypen zustande; eine Beeinflussung kann nur dann auftreten, wenn die BEAS-2B-Zellen lösliche Faktoren in den Überstand abgeben, die anschließend mit den U937-Zellen interagieren. Derartige Experimente wurden u. a. von Regamey *et al.* durchgeführt. Diese stellten fest, dass Blutmonozyten sich in Anwesenheit von BEAS-2B-ECCM zu funktionsfähigen Dendritischen Zellen ausdifferenzieren. Da die Epithelzellen Interleukin-15 in ihren Überstand abgeben und der differenzierende Effekt in Anwesenheit eines IL-15-Antikörpers aufgehoben war, konnte IL-15 als für die Differenzierung verantwortlicher Faktor identifiziert werden (186).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde beobachtet, dass die U937-Zellen bei einer LPS-Konzentration von 100 ng/ml in Anwesenheit des ECCM mehr IL-8 produzieren als in der normalen Kultur ($0,1 \pm 0,4$ pg/ml vs. $7,3 \pm 2$ pg/ml). Kritisch anzumerken ist, dass der verwendete ELISA in diesem niedrigen Konzentrationsbereich eventuell nicht ausreichend empfindlich ist; allerdings wurde

der Versuch achtmal durchgeführt und jedes Mal ein ähnliches Ergebnis erzielt, was darauf hindeutet, dass es sich nicht um eine zufällige Schwankung handelt.

Im Verlauf der Differenzierung von Monozyten ändert sich das Muster ihrer Oberflächenantigene; dies spiegelt sich in der Namensgebung der CD-Antigene wieder (CD = *cluster of differentiation*). Auch die Expression des CD14-Rezeptors und damit die Fähigkeit der Zellen, auf LPS zu reagieren, ändert sich. Wenn nun die U937-Zellen in Anwesenheit des ECCM stärker von LPS stimuliert werden als sonst, ist dies ein Hinweis auf eine Differenzierung, die durch das ECCM induziert wurde. Es stellte sich nun die Frage, welche Bestandteile des konditionierten Mediums hierfür verantwortlich sein können. Aus der Literatur ist bekannt, dass sowohl Retinsäure als auch Vitamin D₃ (1,25- α -Dihydroxycholecalciferol) die CD14-Expression auf U937-Zellen und somit deren Differenzierung zu vollwertigen Monozyten fördern (187). Dies wurde zum Anlass genommen, diese Substanzen im Überstand von BEAS-2B-Zellen nachzuweisen, was jedoch nur für Retinsäure gelang. Der anschließende Versuch, die IL-8-Sekretion der mit LPS stimulierten U937-Zellen durch Zusatz einer entsprechenden Menge Retinsäure zu erhöhen, führte allerdings zu keinem Unterschied im Vergleich zur Kontrolle ohne Retinsäure. Somit kann keine der beiden untersuchten Substanzen für die veränderte Reaktion der mit ECCM kultivierten U937-Zellen verantwortlich sein. Die Identität des verursachenden Faktors bleibt also ungeklärt.

5.2.6 Einfluss von Ingwer-Inhaltsstoffen auf die IL-8-Sekretion

Bestandteile des Ingwerrhizoms werden seit dem Altertum in den unterschiedlichsten Indikationsgebieten arzneilich verwendet. Gut belegt ist vor allem die antagonistische Wirkung am 5-HT₃-Rezeptor, die eine Anwendung bei Übelkeit und Erbrechen rechtfertigt (87, 91). Studien zur antiinflammatorischen Wirkung wurden bisher vornehmlich an Immunzellen wie Monozyten und Makrophagen durchgeführt und beziehen sich häufig auf rheumatische Erkrankungen, wobei die nachgewiesene Hemmung der Cyclooxygenase und der Lipoxigenase den Wirkmechanismus erklärt (99, 100). Ob Ingwerbestandteile auch am Bronchialsystem antiinflammatorisch wirken, wurde bisher wenig untersucht. Eine Studie an Ratten beschreibt, dass die durch eine LPS-Injektion verursachte bronchiale Hyperreagibilität ebenso wie die Serumspiegel von PGE₂ und Thromboxan A₂ vermindert werden, wenn den Tieren zusätzlich ein ethanolischer Ingwerextrakt verabreicht wurde. Auch die Anzahl inflammatorischer Zellen in der Broncheoalveolären Lavage (BAL), die durch LPS erhöht war, konnte durch den Ingwerextrakt wieder vermindert werden (188). Hier

finden sich also bereits Hinweise, dass Ingwerb Bestandteile durch LPS hervorgerufene Entzündungsreaktionen antagonisieren.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen erstmals, dass einige Inhaltsstoffe des Ingwerrhizoms den durch LPS induzierten Anstieg der IL-8-Sekretion von BEAS-2B-Zellen abschwächen können.

Von der Firma Finzelberg wurden zwei Ingwerextrakte zur Verfügung gestellt: ein ethanolischer Spissum- und ein öliger Spezialextrakt, der einen Scharfstoffgehalt von > 25 % aufweist. Diese wurden im Arbeitskreis Prof. Verspohl bisher vor allem im Hinblick auf ihre antidiabetische und 5-HT₃-antagonistische Wirkung untersucht (89), jedoch nicht im Zusammenhang mit dem Bronchialsystem.

BEAS-2B-Zellen wurden wie üblich für 24 h mit LPS stimuliert, wobei jedoch 30 min zuvor jeweils einer der beiden Extrakte in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt wurde. Beim Spissumextrakt zeigte sich zwar in allen eingesetzten Konzentrationen (0,1 bis 1 µg/ml) eine tendenziell verminderte IL-8-Freisetzung, vor allem im Bereich höherer LPS-Konzentrationen, allerdings war der Effekt nicht statistisch signifikant. Der scharfstoffangereicherte Spezialextrakt bewirkte dagegen bei 1 und 10 µg/ml eine signifikante Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve; es konnte also ein hemmender Effekt des Extraktes auf die LPS-induzierte IL-8-Sekretion festgestellt werden. Auf Grund von Löslichkeitsproblemen konnte die eingesetzte Dosis des Spissumextrakts nicht höher als 1 µg/ml gewählt werden, sodass man nicht sagen kann, ob er bei 10 µg/ml ähnlich wirksam wäre wie der Spezialextrakt. Allerdings ist letzterer bereits bei 1 µg/ml stärker wirksam als der Spissumextrakt in derselben Konzentration; daher liegt die Vermutung nahe, dass die beobachtete antiinflammatorische Wirkung auf die Scharfstofffraktion zurückzuführen ist.

Zu den im Ingwerextrakt enthaltenen Scharfstoffen gehören vor allem die homologen Reihen der Gingerole und Shogaole. Exemplarisch wurden die beiden hauptsächlich vorkommenden Vertreter, das [6]-Gingerol und das [6]-Shogaol, auf ihre IL-8-hemmende Wirkung getestet, beide zeigten jedoch unter den gegebenen Bedingungen keinen Effekt. Möglicherweise sind andere, hier nicht untersuchte Scharfstoffe dafür verantwortlich, dass der Spezialextrakt stärker wirksam ist als der Spissumextrakt. Denkbar ist aber auch, dass unterschiedliche Extraktionsmittel bzw. -verfahren die beobachtete Wirkdifferenz verursachen.

Neben der Scharfstofffraktion enthält das Oleoresin des Ingwerrhizoms größere Mengen ätherischen Öls. Zwar wird die antiinflammatorische Wirkung von Ingwerzubereitungen, wie in der Einleitung erläutert, bisher hauptsächlich den Scharfstoffen zugeschrieben, allerdings zeigte das ätherische Öl am hier untersuchten System einen deutlichen Hemmeffekt auf die LPS-induzierte IL-8-Sekretion. Als

Bestandteile des Ingweröls wirkten sich das Sesquiterpen α -Curcumen sowie das Monoterpen α -Pinen inhibitorisch aus; die ebenfalls untersuchten Terpene Citral und β -Phellandren waren jedoch unwirksam.

Das ätherische Ingweröl enthält über 150 verschiedene Komponenten, sodass es im Rahmen der vorliegenden Arbeit unmöglich war festzustellen, welcher Bestandteil in welchem Ausmaß zur antiinflammatorischen Wirkung des Öls beiträgt.

5.3 Untersuchungen zur Rolle von NO bzw. ADMA in den Atemwegen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde am Beispiel der BEAS-2B-Zellen der Einfluss einer LPS-Behandlung auf verschiedene Faktoren untersucht, z. B. auf Proliferation und Zytokinsekretion. Auch ein Zusammenhang zwischen LPS und der Bildung von Stickstoffmonoxid wird in der Literatur beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass LPS an glatten Muskelzellen der menschlichen Aorta die iNOS induziert, somit zu einer verstärkten Bildung von NO führt und gleichzeitig die Ausschüttung von IL-8 und anderen Zytokinen erhöht. Der NOS-Inhibitor L-NAME verminderte die Zytokinsekretion wieder, woraus sich schließen lässt, dass diese durch eine Erhöhung der NO-Synthese vermittelt wurde (163). An murinen RAW 264.7-Makrophagen führt eine Inkubation mit LPS zu einer vermehrten NO-Produktion (189). Alberty *et al.* konnten nachweisen, dass LPS in Nasenepithelzellen die iNOS induziert und infolgedessen die Schlagfrequenz der Zilien steigt, was sich durch die Anwesenheit von L-NAME wieder reduzieren lässt (147).

Es besteht also an verschiedenen Zellsystemen eine Verbindung zwischen inflammatorischen Prozessen, die z. B. durch LPS hervorgerufen werden, und der Aktivierung der NO-Synthase. Wie im folgenden Kapitel erläutert, stellt sich die Situation für BEAS-2B-Zellen im Hinblick auf die Expression von NO-Synthasen widersprüchlich dar. Um zu untersuchen, inwieweit das NO-System an verschiedenen Vorgängen im Respirationstrakt beteiligt ist, erschien die Verwendung von Asymmetrischem Dimethylarginin sinnvoll. Dies ist im Gegensatz zu L-NAME und L-NMMA ein endogener Inhibitor der NO-Synthase, sodass hiermit erhaltene Ergebnisse einen höheren Stellenwert bezüglich der physiologischen Relevanz hätten.

5.3.1 Beeinflussung der Zytokinproduktion

Asymmetrisches Dimethylarginin erhöht an Gefäßendothelzellen die Bildung verschiedener proinflammatorischer Faktoren wie MCP, NF κ B, TNF α und IL-8 (142, 144). Auch an Adipozyten konnte gezeigt werden, dass ADMA die Bildung von TNF α

und Reaktiven Sauerstoffspezies sowie die Expression des Toll-like-Rezeptors 4 begünstigt (190). Chen *et al.* fanden an humanen monozytoiden Zellen (THP-1) eine verstärkte Bildung von IL-8, TNF α , MCP-1, ROS und NF κ B (191). Ob Ähnliches auch für Zellen des Respirationstrakts gilt, wurde bisher nicht beschrieben.

An der hier untersuchten Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B konnte selbst beim Einsatz hoher ADMA-Konzentrationen von bis zu 30 mM keine Ausschüttung von TNF α beobachtet werden. Zunächst wurde vermutet, dass die hohe Proteinbindung des ADMA ein Abfangen des TNF α bewirkt und dieses daher nicht detektiert werden kann. Wie im Ergebnisteil beschrieben, ließ sich diese Hypothese durch die Aufnahme verschiedener TNF α -Standardkurven in Anwesenheit von ADMA widerlegen.

BEAS-2B-Zellen eignen sich möglicherweise grundsätzlich nicht dazu, Untersuchungen zur Rolle von NO in den Atemwegen durchzuführen. Zu diesem Schluss kommt die Gruppe von Watkins *et al.* (192). Den Autoren gelang es nicht, mRNA für die beiden konstitutiv vorhandenen Formen der NO-Synthase (eNOS und nNOS) in BEAS-2B-Zellen nachzuweisen. Zwar konnte an Zellen, die mit einer Kombination aus TNF α , IFN γ und LPS behandelt wurden, mRNA für die induzierbare NOS nachgewiesen werden, wobei auch ein erhöhter Nitritgehalt im Zellüberstand gemessen wurde. Allerdings nahm diese Reaktion mit zunehmender Passagezahl schnell ab. Die ebenfalls untersuchte Stimulation mit Histamin führte zu keinem messbaren Effekt im Hinblick auf die NO-Synthase. Auch Uetani *et al.* berichten, dass die iNOS an BEAS-2B-Zellen nicht durch Zytokine induziert werden kann, im Gegensatz zu primären Bronchialepithelzellen und der Alveolarepithelzelllinie A549 (193). Andererseits hatten Asano *et al.* 1994 die Existenz von sowohl konstitutiver als auch induzierbarer NOS in BEAS-2B-Zellen propagiert (194). Die Datenlage in der Literatur ist also nicht eindeutig; wenn man jedoch davon ausgeht, dass die verwendete Zelllinie gar nicht mit NO-Synthasen ausgestattet ist und diese auch nicht durch Stimulation induziert werden können, ist es auch nicht verwunderlich, dass der NO-Synthasehemmer ADMA an diesem System keinen Effekt aufweist.

Unklar ist des Weiteren, ob die verwendeten Zellen überhaupt grundsätzlich zur Bildung von TNF α in der Lage sind, da auch eine Stimulation mit Substanz P, CGRP und LPS nicht zu messbaren Effekten führt. Der ausbleibende Effekt des ADMA könnte also auch hierin begründet liegen. Daher wurde untersucht, welche Zytokine BEAS-2B-Zellen überhaupt bilden können, um die Planung weiterer Versuche zu erleichtern. Das semiquantitative Zytokinscreening ergab eine verstärkte Sekretion von u. a. RANTES, IL-8, IL-6, IP10, I-TAC, sICAM-1 und MCP 1 als Reaktion auf eine Stimulation mit TNF α und IFN γ . Die Inkubation mit ADMA zeigte jedoch keinerlei Veränderung im Vergleich zur unstimulierten Negativkontrolle.

Im Gegensatz zu $\text{TNF}\alpha$ ist also gesichert, dass BEAS-2B-Zellen in der Lage sind, z. B. IL-8 und RANTES zu bilden. Zur genaueren Untersuchung wurden mittels ELISA die Konzentrationen dieser beiden Zytokine in Anwesenheit von ADMA gemessen, allerdings zeigte die Substanz auch hier keine Wirkung, während die Zytokinproduktion nach Stimulation mit der Positivkontrolle ($\text{TNF}\alpha/\text{IFN}\gamma$) stark erhöht war.

An glatten Muskelzellen der Aorta hemmt der NO-Synthasehemmer L-NAME die durch LPS induzierte IL-8-Sekretion, diese muss also über eine vermehrte NO-Synthese vermittelt werden (163). Bei den in dieser Arbeit untersuchten BEAS-2B-Zellen hatte der endogene NO-Synthasehemmer ADMA keinen Einfluss auf die IL-8-Sekretion LPS-stimulierter Zellen; der zugrundeliegende Mechanismus scheint also nicht im Zusammenhang mit einer erhöhten NO-Bildung durch LPS zu stehen. Direkte NO-Messungen wurden allerdings nicht durchgeführt.

Insgesamt konnte kein Einfluss von ADMA auf die Zytokinsekretion von BEAS-2B-Zellen festgestellt werden.

5.3.2 Auswirkungen auf die CBF

Die ziliäre Schlagfrequenz (CBF) dient der Messung des mukoziliären Transports, der für die Entfernung eingeatmeter Pathogene und Partikel aus den Atemwegen von entscheidender Bedeutung ist.

Die CBF wurde an Explantaten aus der Rattentrachea gemessen, wie im Methodenteil beschrieben. Eine Hochgeschwindigkeitskamera zeichnet dabei die Bewegung der Zilien auf und misst gleichzeitig die Schlagfrequenz. Während geringere ADMA-Konzentrationen keinerlei Effekt zeigten, konnte mit der unrealistisch hohen Konzentration von 10 mM eine geringfügige Abnahme der CBF auf 92 % der Kontrolle gezeigt werden.

Ein Teil der Explantate wurde vor der Zugabe des ADMA für 24 h mit einer Kombination aus $\text{TNF}\alpha$ und LPS stimuliert. Dadurch sollte untersucht werden, ob die iNOS von den Stimulantien heraufreguliert und anschließend durch ADMA wieder gehemmt wird, ob also NO eine eventuelle CBF-steigernde Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ und LPS vermittelt; dies könnte indirekt nachgewiesen werden, wenn ADMA an stimulierten Präparaten einen stärkeren CBF-hemmenden Effekt aufwies als an unstimulierten. Für Zilien von Nasenepithel-explantaten konnte dies von Alberty *et al.* gezeigt werden (147), allerdings verwendeten die Autoren nicht ADMA, sondern das nicht endogene L-NAME als NOS-Inhibitor. Die absoluten CBF-Werte von stimulierten und unstimulierten Explantaten zu vergleichen hat in diesem Fall keinen Sinn, da die Messwerte auch innerhalb eines einzelnen Tracheastückes stark schwanken. Eine Untersuchung am

selben Präparat vor und nach einer z. B. 24-stündigen Stimulation ist ebenfalls nicht möglich, da man dieselbe Stelle im Präparat am nächsten Tag nicht wiederfindet.

Im hier untersuchten Modell konnte nur mit extrem hohen, nicht physiologischen ADMA-Konzentrationen (10 mM) ein geringfügiger Unterschied zwischen stimulierten und unstimulierten Explantaten festgestellt werden, der jedoch auf Grund starker Schwankungen nicht statistisch signifikant ist. Die von Alberty *et al.* am Nasenepithel mit L-NAME gefundenen Ergebnisse konnten also im vorliegenden System nicht beobachtet werden – weder eine Erhöhung der CBF durch TNF α und LPS noch eine Beteiligung der iNOS daran. Dieser Nachweis wäre im Zusammenhang mit entzündlichen Atemwegserkrankungen insofern interessant gewesen, als bei inflammatorischen Prozessen vermehrt Zytokine gebildet werden, welche die iNOS induzieren; dadurch würde wiederum die CBF erniedrigt und somit die Funktion des Bronchialepithels eingeschränkt.

In der zweiten durchgeführten Versuchsreihe wurde nicht mit TNF α und LPS stimuliert; stattdessen wurde ein Teil der Explantate für eine Stunde mit dem Angiotensin II-Antagonisten Losartan vorbehandelt. In verschiedenen Arbeiten wurde beschrieben, dass Losartan bestimmte ADMA-Effekte wieder aufheben kann. So wird der von ADMA verursachte Anstieg der Monozytenadhäsion, ROS-Sekretion und NF κ B-Expression an THP-1-Zellen durch Losartan-Vorbehandlung abgeschwächt (195). Im Zusammenhang mit der CBF findet sich in der Literatur bisher kein Hinweis auf eine Beteiligung von Angiotensin II oder Losartan, zumindest nicht an der Trachea; im weiblichen Eileiter wurden dagegen Rezeptoren für Angiotensin II gefunden sowie eine Steigerung der ziliären Schlagfrequenz durch Angiotensin II festgestellt, die durch Losartan wieder aufgehoben werden konnte (196).

Am hier untersuchten System konnte nicht eindeutig gezeigt werden, ob Losartan den ohnehin schon sehr geringen Effekt des ADMA wieder aufhebt. Bei einigen Präparaten hörten die Zilien ohne erkennbaren Grund irreversibel auf zu schlagen, während an anderen Stücken dieselben Bedingungen keinerlei Auswirkung hatten.

Methodenkritik

Die hier verwendete Methode zur Messung der CBF weist mehrere Schwachpunkte auf. Zum einen ist die Tatsache problematisch, dass auch innerhalb eines einzelnen Tracheaexplantats stark schwankende Messwerte aufgezeichnet werden. Zwei unterschiedlich behandelte Stücke können also nicht direkt miteinander verglichen werden, was jedoch z. B. bei der Inkubation mit Stimulantien wünschenswert wäre. Dies lässt sich nur durch indirekte Methoden umgehen, wie oben beschrieben. Das

zweite Problem ist der Auswertemodus, der von den einzelnen Autoren ganz unterschiedlich gewählt wird. Während einige Arbeitsgruppen beispielsweise den Mittelwert einer bestimmten Anzahl aufeinanderfolgender Messwerte bilden, ziehen andere den niedrigsten Wert innerhalb eines bestimmten Zeitraums zur Auswertung heran. Mit derselben Logik könnte man auch den höchsten gemessenen Wert verwenden oder den Messzeitraum auf eine willkürliche gewählte Zeitspanne ausdehnen oder verkürzen. Die Erfahrung wird erst noch zeigen müssen, welche Methode für die jeweilige Fragestellung am besten geeignet ist.

5.3.3 Einfluss auf die Tracheakontraktion

An der glatten Muskulatur von Blutgefäßen konnte gezeigt werden, dass ADMA deren Kontraktilität erhöht (148). Dies erklärt sich dadurch, dass NO über eine Aktivierung der Guanylylcyclase und die daraus resultierende Erhöhung des cGMP-Spiegels zur Relaxation glatter Muskulatur beiträgt. In Anwesenheit von ADMA wird wegen der Hemmung der NO-Synthase weniger NO gebildet, die Relaxierung durch NO fällt weg und es kommt zu verstärkter Kontraktion.

Durch Carbachol kann an der isolierten Rattentrachea im Organbad eine Kontraktion ausgelöst werden. Carbachol ist ein Strukturanalogon zu Acetylcholin und wirkt durch die Aktivierung muskarinischer Acetylcholinrezeptoren parasymphomimetisch, hat aber eine deutlich längere Halbwertszeit als Acetylcholin.

Durch Vorinkubation mit ADMA wurde versucht, die Reaktion der isolierten Rattentrachea auf Carbachol zu verändern. Die theoretische Hintergedanke dazu war, dass durch die Hemmung der NO-Synthase weniger relaxierendes NO zur Verfügung steht und die glatte Muskulatur somit in Anwesenheit von ADMA stärker kontrahiert wird; dies würde sich in einer Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve von Carbachol äußern.

Auch sehr hohe ADMA-Konzentrationen von 1 mM hatten keinen Einfluss auf die Carbachol-induzierte Kontraktion, ebenso wenig hatte ADMA einen kontrahierenden Eigeneffekt. Ein Erklärungsansatz hierfür könnte sein, dass die NO-Synthase in diesem Modell nur auf sehr niedrigem Level arbeitet und eine Hemmung durch ADMA somit keinen Einfluss hat. In der Literatur wird allerdings z. T. auch beschrieben, dass ein vermindertes NO-Angebot durch den Einsatz von NO-Inhibitoren keinen kontrahierenden, sondern einen relaxierenden Effekt auf die glatte Muskulatur hat. Dies wird dadurch erklärt, dass die Anwesenheit des freien Radikals NO zu einer Hyperreagibilität der glatten Atemwegsmuskulatur sowie zu Schäden am Epithel führt. Antosová *et al.* behandelten Meerschweinchen mit dem NO-Synthaseinhibitor L-NAME

und anschließend mit Toluol, das die Empfindlichkeit des später isolierten Tracheamuskels auf Histamin und Acetylcholin erhöht. Bei den mit L-NAME vorbehandelten Tieren war diese Toluol-induzierte Hyperreagibilität wieder herabgesetzt (197); der NOS-Inhibitor hatte also hier einen protektiven Effekt.

Der ausbleibende Effekt von ADMA in diesem Modell kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass die beiden beschriebenen Phänomene – verminderte Relaxation durch ein niedrigeres NO-Angebot und abgeschwächte Empfindlichkeit durch weniger NO-bedingte Schäden am Epithel – sich gegenseitig aufheben. Dazu müssten jedoch beide Effekte gleich stark ausgeprägt sein, da die Dosis-Wirkungskurve des Carbachols überhaupt nicht verschoben ist; dies erscheint recht unwahrscheinlich.

Eine Behandlung der isolierten Rattentrachea mit L-Arginin, dem physiologischen Substrat der NO-Synthase, hatte ebenfalls weder einen Eigeneffekt noch eine Auswirkung auf die Dosis-Wirkungskurve des Carbachols. Wenn ausreichend Enzymaktivität gegeben wäre, müsste ein vermehrtes Substratangebot zu einer verstärkten Bildung von NO und damit zu einer relaxierenden Wirkung, also einer Rechtsverschiebung der Kurve führen. Dass dies nicht beobachtet werden konnte, liegt möglicherweise daran, dass entweder nicht ausreichend NOS vorhanden ist oder sie bereits auf höchstem Level arbeitet, sodass ein weiteres Substratangebot keinen Einfluss mehr hat. Falls letztere Vermutung zuträfe, müsste sich jedoch die Hemmung des Enzyms durch ADMA bemerkbar machen. Ob das Angebot an NOS nicht ausreicht, ließe sich nur durch einen bekannten Induktor des Enzyms nachweisen. Ein solcher wurde zwar von Arora *et al.* beschrieben (167) und freundlicherweise zur Verfügung gestellt, allerdings konnte die Substanz im Organbad nicht getestet werden, da das als Lösemittel notwendige DMSO einen nicht zu kontrollierenden Eigeneffekt auf die Rattentrachea aufwies.

Der Verdacht, dass ein verändertes NO-Angebot am untersuchten System unter Umständen grundsätzlich folgenlos für die Tracheakontraktion ist, konnte durch Versuche mit dem NO-Donator SIN-1 widerlegt werden. Dieser setzt nicht-enzymatisch NO frei, die NOS spielt hier also keine Rolle. Eine Vorinkubation mit SIN-1 führte zu einer zwar geringen, aber statistisch signifikanten Reduktion der durch 3,2 μ M Carbachol hervorgerufenen Kontraktion. Ein Mehr an NO, wie es auch durch die Zugabe des L-Arginins erreicht werden sollte, führt also durchaus zu einer Relaxation bzw. einem verringerten Ansprechen der Rattentrachea auf das kontrahierende Agens Carbachol. Warum weder ADMA noch L-Arginin die Kontraktibilität des Organs verändern, konnte nicht abschließend geklärt werden.

6 Zusammenfassung

Untersuchungen zu CD14-Expression, Proliferation, Zytokinsekretion und intrazellulären Signalwegen an LPS-stimulierten BEAS-2B-Zellen

- Der CD14-Rezeptor ist auf der humanen Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B exprimiert und wird als lösliche Form (sCD14) von diesen sezerniert. Die Expression wird jedoch durch Inkubation mit Lipopolysacchariden nicht erhöht.
- LPS fördert die Proliferation von BEAS-2B-Zellen; hieran sind die MAPK p38 und JNK, die PI3-Kinase sowie Tyrosinkinase beteiligt.
- Der Tyrosinkinaseinhibitor Genistein verändert die Proliferation von BEAS-2B-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration.
- BEAS-2B-Zellen reagieren auf die Stimulation mit Lipopolysacchariden konzentrationsabhängig mit der Aktivierung von NFκB. Die Reaktion hängt auch von der Spezies ab, von der das LPS stammt: *E. coli*-LPS führt bereits in viel geringeren Konzentrationen zu einer starken NFκB-Aktivierung als Lipopolysaccharide von *P. aeruginosa*.
- Ebenso bewirkt LPS an BEAS-2B-Zellen eine zeit- und konzentrationsabhängige Sekretionssteigerung von Interleukin-8. Die Zellen reagieren dabei auf LPS von *E. coli* wesentlich empfindlicher als auf jenes von *P. aeruginosa*.
- An dieser Reaktion ist der CD14-Rezeptor beteiligt; er hat also auf diesen Zellen eine Funktion.
- In geringerem Ausmaß wird nach LPS-Kontakt auch RANTES von BEAS-2B-Zellen gebildet; eine Ausschüttung von TNFα kann jedoch durch *P. aeruginosa*-LPS nicht erreicht werden.
- An der LPS-vermittelten IL-8-Ausschüttung sind die drei MAPK-Wege ERK 1/2, JNK und p38 in unterschiedlichem Ausmaß beteiligt.
- Auch die PI3-Kinase und Tyrosinkinase haben einen Anteil an der untersuchten Signalkaskade, ebenso wie der NFκB-Weg und die IRAK.
- Interleukin-8 scheint in diesem System seine eigene Freisetzung über einen negativen Feedbackmechanismus zu hemmen.
- Die Kultivierung von U937-Zellen in ECCM von BEAS-2B-Zellen führt bei bestimmten LPS-Konzentrationen zu einer verstärkten IL-8-Ausschüttung im Vergleich zur normalen Kultur. Diese veränderte Reaktion ist weder auf Vitamin D₃ noch auf Retinsäure zurückzuführen; die verantwortliche Substanz bleibt unbekannt.

Schlussfolgerung

- Lipopolysaccharide induzieren an BEAS-2B-Bronchialepithelzellen verschiedene immunologisch relevante Prozesse wie Proliferation, NF κ B-Aktivierung sowie die Sekretion der Zytokine IL-8 und RANTES.
- Durch die vorliegende Arbeit wurden die intrazellulären Signalkaskaden aufgeklärt, die diesen Prozessen zugrunde liegen.
- Die hier gezeigten Untersuchungen bestätigen und erweitern die Hypothese, dass das Bronchialepithel nicht nur eine mechanische Barriere für eingedrungene Pathogene ist, sondern auch auf zellulärer Ebene einen bedeutenden Beitrag zur angeborenen Immunität leistet.

Untersuchungen zum Einfluss von Ingwer-Inhaltsstoffen auf die LPS-induzierte IL-8-Sekretion

- Ein scharfstoffangereicherter öliger Spezialextrakt von *Zingiber officinale* führt zu einer Hemmung der LPS-vermittelten IL-8-Sekretion; der ebenfalls getestete Gesamtextrakt ist weniger stark wirksam. Auch das ätherische Öl sowie das Sesquiterpen α -Curcumen und das Monoterpen α -Pinen hemmen die Sekretion, wohingegen Citral, β -Phellandren sowie die Scharfstoffe 6-Gingerol und 6-Shogaol keinen Effekt zeigen.

Schlussfolgerung

- Verschiedene Inhaltsstoffe von *Zingiber officinale* üben im Hinblick auf die IL-8-Sekretion einen protektiven Effekt auf LPS-stimulierte BEAS-2B-Zellen aus und kommen eventuell in Zukunft als Arzneistoffe bei entzündlichen Atemwegserkrankungen in Betracht.

Untersuchungen zur Wirkung von ADMA auf das Bronchialsystem

- Der endogene NO-Synthasehemmer ADMA führt nicht zu einer verstärkten Ausschüttung von TNF α , Interleukin-8, RANTES und weiteren Zytokinen an BEAS-2B-Zellen. Auch die LPS-induzierte IL-8-Sekretion wird durch ADMA nicht beeinflusst.
- Ebenso wenig verändert ADMA in physiologisch sinnvollen Konzentrationen die ziliäre Schlagfrequenz an Explantaten der Rattentrachea; auch Losartan zeigt hier keinen modulierenden Effekt.
- An der isolierten Rattentrachea zeigt weder ADMA noch das natürliche Substrat der NO-Synthase, L-Arginin, einen Einfluss auf die Carbachol-vermittelte

Kontraktion. Dass das System jedoch grundsätzlich auf ein verändertes NO-Angebot reagiert, wird durch den relaxierenden Effekt des NO-Donators SIN-1 deutlich.

Schlussfolgerung

- In keinem der hier untersuchten Modelle konnte eine Wirkung des Asymmetrischen Dimethylarginin auf das Bronchialsystem festgestellt werden.

7 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1 Struktur eines Lipopolysaccharids
- Abb. 1.2 Intrazelluläre Signalwege nach LPS-Stimulation
- Abb. 1.3 Modellhafte Darstellung der MAPK-Kaskade
- Abb. 1.4 *Zingiber officinale* aus Köhler's Medizinal-Pflanzen
- Abb. 1.5 Ingwerwurzelstock (*Zingiberis rhizoma*)
- Abb. 1.6 Strukturformeln von Arginin-Analoga
- Abb. 2.1 Aufsicht auf das Organbad
- Abb. 2.2 Schematische Darstellung des Organbads
- Abb. 4.1 Die Anwesenheit von CD14 auf BEAS-2B-Zellen
- Abb. 4.2 Dot Blot auf CD14 bei BEAS-2B-Zellen
- Abb. 4.3 Zeitabhängigkeit der sCD14-Sekretion in den Überstand von BEAS-2B-Zellen
- Abb. 4.4 Einfluss der LPS-Stimulation auf die Proliferation von BEAS-2B-Zellen
- Abb. 4.5 Einfluss spezifischer Inhibitoren auf die LPS-induzierte Proliferation
- Abb. 4.6 Einfluss von Genistein auf die Proliferation von BEAS-2B-Zellen
- Abb. 4.7 Die Aktivierung intrazellulärer Kinasen durch LPS
- Abb. 4.8 Densitometrische Auswertung des Proteome Profiler® Arrays
- Abb. 4.9 Einfluss von LPS auf die Aktivierung von NFκB
- Abb. 4.10 Vergleich der NFκB-Aktivierung von LPS von *P. aeruginosa* und *E. coli*
- Abb. 4.11 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Interleukin-8-Sekretion nach Stimulation mit LPS
- Abb. 4.12 Auswirkung von LPS auf die RANTES-Freisetzung in BEAS-2B-Zellen
- Abb. 4.13 Vergleich des Effekts von LPS verschiedener Spezies auf die IL-8-Sekretion
- Abb. 4.14 Dosis-Wirkungskurve von *E. coli*-LPS in Bezug auf die IL-8-Sekretion
- Abb. 4.15 Einfluss des CD14-Antikörpers 18D11 auf die LPS-induzierte IL-8-Sekretion
- Abb. 4.16 Hemmung der IL-8-Sekretion durch PD 98059
- Abb. 4.17 Hemmung der IL-8-Sekretion durch SB 202190
- Abb. 4.18 Hemmung der IL-8-Sekretion durch SP 600125
- Abb. 4.19 Hemmung der IL-8-Sekretion durch Genistein
- Abb. 4.20 Hemmung der IL-8-Sekretion durch LY 294002
- Abb. 4.21 Beeinflussung der IL-8-Sekretion durch den IRAK-1/4-Inhibitor
- Abb. 4.22 Beeinflussung der IL-8-Sekretion durch den CXCR2-Rezeptor-Antagonisten SB 225002

- Abb. 4.23 Beeinflussung der IL-8-Sekretion durch den NF κ B-Inhibitor SN50
- Abb. 4.24 Beeinflussung der IL-8-Sekretion durch einen Ingwer-Spissumextrakt
- Abb. 4.25 Beeinflussung der IL-8-Sekretion durch einen Ingwer-Spezialextrakt
- Abb. 4.26 Einfluss von ätherischem Ingweröl auf die IL-8-Sekretion
- Abb. 4.27 Einfluss von α -Curcumen und α -Pinen auf die IL-8-Sekretion
- Abb. 4.28 Beeinflussung der IL-8-Sekretion von U937-Zellen durch BEAS-2B-ECCM
- Abb. 4.29 HPLC zum Nachweis von Retinsäure
- Abb. 4.30 Einfluss von TNF α und IFN γ auf die Zytokinproduktion in BEAS-2B-Zellen
- Abb. 4.31 Einfluss von ADMA auf die Dosis-Wirkungskurve von Carbachol an der isolierten Rattentrachea
- Abb. 4.32 Einfluss von L-Arginin auf die Dosis-Wirkungskurve von Carbachol an der isolierten Rattentrachea
- Abb. 4.33 Einfluss von SIN-1 auf die Carbachol-Kontraktion
- Abb. 5.1 Zusammenfassung: Mögliche Signalwege in BEAS-2B-Zellen

8 Literaturverzeichnis

1. Janeway C (Hrsg.), 2002. *Immunologie*, 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
2. Martin M (Hrsg.), 2009. *Immunologie*, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
3. Beutler B. 2004. Innate immunity: An overview. *Mol. Immunol.* 40: 845-859
4. Ramasundara M, Leach ST, Lemberg DA, Day AS. 2009. Defensins and inflammation: The role of defensins in inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 24 : 202-208
5. Glaser R, Harder J, Lange H, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. 2005. Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from escherichia coli infection. *Nat. Immunol.* 6 : 57-64
6. Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. 2002. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 14 : 123-128
7. Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, Lavu S, Kobayashi Y, et al. 1988. Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 167: 1883-1893
8. Mukaida N. 2003. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 284 : 566-577
9. Rajarathnam K, Sykes BD, Kay CM, Dewald B, Geiser T, et al. 1994. Neutrophil activation by monomeric interleukin-8. *Science.* 264 : 90-92
10. Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, Rice GC, Wood WI. 1991. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science.* 253 : 1278-1280
11. Carveth HJ, Bohnsack JF, McIntyre TM, Baggiolini M, Prescott SM, Zimmerman GA. 1989. Neutrophil activating factor (NAF) induces polymorphonuclear leukocyte adherence to endothelial cells and to subendothelial matrix proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162 : 387-393
12. Balkwill FR, Burke F. 1989. The cytokine network. *Immunol. Today.* 10 : 299-304
13. Bussolino F, Sironi M, Bocchietto E, Mantovani A. 1992. Synthesis of platelet-activating factor by polymorphonuclear neutrophils stimulated with interleukin-8. *J. Biol. Chem.* 267 : 14598-14603
14. Schroder JM. 1989. The monocyte-derived neutrophil activating peptide (NAP/interleukin 8) stimulates human neutrophil arachidonate-5-lipoxygenase, but not the release of cellular arachidonate. *J. Exp. Med.* 170 : 847-863
15. Broaddus VC, Boylan AM, Hoeffel JM, Kim KJ, Sadick M, et al. 1994. Neutralization of IL-8 inhibits neutrophil influx in a rabbit model of endotoxin-induced pleurisy. *J. Immunol.* 152 : 2960-2967
16. Martich GD, Danner RL, Ceska M, Suffredini AF. 1991. Detection of interleukin 8 and tumor necrosis factor in normal humans after intravenous endotoxin: The effect of antiinflammatory agents. *J. Exp. Med.* 173 : 1021-1024
17. Van Zee KJ, DeForge LE, Fischer E, Marano MA, Kenney JS, et al. 1991. IL-8 in septic shock, endotoxemia, and after IL-1 administration. *J. Immunol.* 146 : 3478-3482

18. Donnelly SC, Strieter RM, Kunkel SL, Walz A, Robertson CR, et al. 1993. Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups. *Lancet*. 341 : 643-647
19. Sekido N, Mukaida N, Harada A, Nakanishi I, Watanabe Y, Matsushima K. 1993. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature*. 365 : 654-657
20. Laffon M, Pittet JF, Modelska K, Matthay MA, Young DM. 1999. Interleukin-8 mediates injury from smoke inhalation to both the lung endothelial and the alveolar epithelial barriers in rabbits. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 160 : 1443-1449
21. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. 1996. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 153 : 530-534
22. Shannon J, Ernst P, Yamauchi Y, Olivenstein R, Lemiere C, et al. 2008. Differences in airway cytokine profile in severe asthma compared to moderate asthma. *Chest*. 133 : 420-426
23. Kurashima K, Mukaida N, Fujimura M, Schroder JM, Matsuda T, Matsushima K. 1996. Increase of chemokine levels in sputum precedes exacerbation of acute asthma attacks. *J. Leukoc. Biol*. 59 : 313-316
24. Fujimura M, Myou S, Nomura M, Mizuguchi M, Matsuda T, et al. 1999. Interleukin-8 inhalation directly provokes bronchoconstriction in guinea pigs. *Allergy*. 54 : 386-391
25. Chiu JC, Hsu JY, Fu LS, Chu JJ, Chi CS. 2007. Comparison of the effects of two long-acting beta2-agonists on cytokine secretion by human airway epithelial cells. *J. Microbiol. Immunol. Infect*. 40 : 388-394
26. Strandberg K, Palmberg L, Larsson K. 2007. Effect of formoterol and salmeterol on IL-6 and IL-8 release in airway epithelial cells. *Respir. Med*. 101 : 1132-1139
27. Liu G, Zhu R, Li B. 2005. TNF-alpha and IL-8 of the patients with allergic asthma. *J. Huazhong Univ. Sc.i Technolog. Med. Sci*. 25 : 274-275, 309
28. Fukakusa M, Bergeron C, Tulic MK, Fiset PO, Al Dewachi O, et al. 2005. Oral corticosteroids decrease eosinophil and CC chemokine expression but increase neutrophil, IL-8, and IFN-gamma-inducible protein 10 expression in asthmatic airway mucosa. *J. Allergy Clin. Immunol*. 115 : 280-286
29. Schroder JM, Kameyoshi Y, Christophers E. 1994. RANTES, a novel eosinophil-chemotactic cytokine. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 725 : 91-103
30. Zhu J, Qiu YS, Majumdar S, Gamble E, Matin D, et al. 2001. Exacerbations of bronchitis: Bronchial eosinophilia and gene expression for interleukin-4, interleukin-5, and eosinophil chemoattractants. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 164: 109-116
31. Saeki T, Naya A. 2003. CCR1 chemokine receptor antagonist. *Curr. Pharm. Des*. 9 : 1201-1208
32. Hof H., Dörries R. 2009. *Medizinische Mikrobiologie*, 4. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart

33. Engel C. 2007. Diagnose und Epidemiologie der Sepsis. *Deutsches Ärzteblatt*. 414-417
34. Hahn H., Falke D., Kaufmann S.H.E., Ullmann U. 2004. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, 5. Auflage. Springer Verlag, Berlin
35. Oberg F, Botling J, Nilsson K. 1993. Functional antagonism between vitamin D3 and retinoic acid in the regulation of CD14 and CD23 expression during monocytic differentiation of U-937 cells. *J. Immunol.* 150 : 3487-3495
36. Griffin JE, Allman DR, Durrant JL, Wilson JD. 1981. Variation in steroid 5 alpha-reductase activity in cloned human skin fibroblasts. shift in phenotypic expression from high to low activity upon subcloning. *J. Biol. Chem.* 256 : 3662-3666
37. Jersmann HP, Hii CS, Hodge GL, Ferrante A. 2001. Synthesis and surface expression of CD14 by human endothelial cells. *Infect. Immun.* 69 : 479-485
38. Jersmann HP. 2005. Time to abandon dogma: CD14 is expressed by non-myeloid lineage cells. *Immunol. Cell. Biol.* 83 : 462-467
39. Todd RF,3rd, Van Agthoven A, Schlossman SF, Terhorst C. 1982. Structural analysis of differentiation antigens Mo1 and Mo2 on human monocytes. *Hybridoma.* 1 : 329-337
40. Haziot A, Chen S, Ferrero E, Low MG, Silber R, Goyert SM. 1988. The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J. Immunol.* 141 : 547-552
41. Bazil V, Baudys M, Hilgert I, Stefanova I, Low MG, et al. 1989. Structural relationship between the soluble and membrane-bound forms of human monocyte surface glycoprotein CD14. *Mol. Immunol.* 26 : 657-662
42. Bazil V, Horejsi V, Baudys M, Kristofova H, Strominger JL, et al. 1986. Biochemical characterization of a soluble form of the 53-kDa monocyte surface antigen. *Eur. J. Immunol.* 16 : 1583-1589
43. Wu Z, Rothwell L, Hu T, Kaiser P. 2009. Chicken CD14, unlike mammalian CD14, is trans-membrane rather than GPI-anchored. *Dev. Comp. Immunol.* 33 : 97-104
44. Ferrero E, Hsieh CL, Francke U, Goyert SM. 1990. CD14 is a member of the family of leucine-rich proteins and is encoded by a gene syntenic with multiple receptor genes. *J. Immunol.* 145 : 331-336
45. Goyert SM, Ferrero E, Rettig WJ, Yenamandra AK, Obata F, Le Beau MM. 1988. The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors. *Science.* 239 : 497-500
46. Tobias PS, Ulevitch RJ. 1994. Lipopolysaccharide-binding protein and CD14 in the lipopolysaccharide-dependent activation of cells. *Chest.* 105 : 48S-50S
47. Pugin J, Schurer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS. 1993. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90 : 2744-2748
48. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science.* 249 : 1431-1433
49. Tobias PS, Ulevitch RJ. 1993. Lipopolysaccharide binding protein and CD14 in LPS dependent macrophage activation. *Immunobiology.* 187 : 227-232

50. Hailman E, Vasselon T, Kelley M, Busse LA, Hu MC, et al. 1996. Stimulation of macrophages and neutrophils by complexes of lipopolysaccharide and soluble CD14. *J. Immunol.* 156 : 4384-4390
51. Golenbock DT, Liu Y, Millham FH, Freeman MW, Zoeller RA. 1993. Surface expression of human CD14 in chinese hamster ovary fibroblasts imparts macrophage-like responsiveness to bacterial endotoxin. *J. Biol. Chem.* 268 : 22055-22059
52. Schulz C, Farkas L, Wolf K, Kratzel K, Eissner G, Pfeifer M. 2002. Differences in LPS-induced activation of bronchial epithelial cells (BEAS-2B) and type II-like pneumocytes (A-549). *Scand. J. Immunol.* 56 : 294-302
53. Funda DP, Tuckova L, Farre MA, Iwase T, Moro I, Tlaskalova-Hogenova H. 2001. CD14 is expressed and released as soluble CD14 by human intestinal epithelial cells in vitro: Lipopolysaccharide activation of epithelial cells revisited. *Infect. Immun.* 69 : 3772-3781
54. Smit LA, Siroux V, Bouzigon E, Oryszczyn MP, Lathrop M, et al. 2009. CD14 and toll-like receptor gene polymorphisms, country living, and asthma in adults. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 179 : 363-368
55. Gu W, Dong H, Jiang DP, Zhou J, Du DY, et al. 2008. Functional significance of CD14 promoter polymorphisms and their clinical relevance in a chinese han population. *Crit. Care Med.* 36 : 2274-2280
56. Baumgart DC, Buning C, Geerds L, Schmidt HH, Genschel J, et al. 2007. The c.1-260C>T promoter variant of CD14 but not the c.896A>G (p.D299G) variant of toll-like receptor 4 (TLR4) genes is associated with inflammatory bowel disease. *Digestion.* 76 : 196-202
57. Barber RC, Chang LY, Arnaldo BD, Purdue GF, Hunt JL, et al. 2006. Innate immunity SNPs are associated with risk for severe sepsis after burn injury. *Clin. Med. Res.* 4 : 250-255
58. Grip O, Janciauskiene S, Bredberg A. 2008. Use of atorvastatin as an anti-inflammatory treatment in crohn's disease. *Br. J. Pharmacol.* 155 : 1085-1092
59. Anderson KV, Jurgens G, Nusslein-Volhard C. 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the drosophila embryo: Genetic studies on the role of the toll gene product. *Cell.* 42 : 779-789
60. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in drosophila adults. *Cell.* 86 : 973-983
61. Beutler B. 2004. Inferences, questions and possibilities in toll-like receptor signalling. *Nature.* 430 : 257-263
62. Beutler B. 2002. TLR4 as the mammalian endotoxin sensor. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 270 : 109-120
63. Guha M, Mackman N. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* 13 : 85-94
64. Mayer AK, Muehmer M, Mages J, Gueinzus K, Hess C, et al. 2007. Differential recognition of TLR-dependent microbial ligands in human bronchial epithelial cells. *J. Immunol.* 178 : 3134-3142

65. Rossignol DP, Wasan KM, Choo E, Yau E, Wong N, et al. 2004. Safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and plasma lipoprotein distribution of eritoran (E5564) during continuous intravenous infusion into healthy volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 : 3233-3240
66. Raman M, Chen W, Cobb MH. 2007. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene.* 26 : 3100-3112
67. Ray LB, Sturgill TW. 1987. Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84 : 1502-1506
68. Rossomando AJ, Payne DM, Weber MJ, Sturgill TW. 1989. Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86 : 6940-6943
69. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, et al. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* 22 : 153-183
70. Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, et al. 2001. MAP kinases. *Chem. Rev.* 101 : 2449-2476
71. Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, et al. 1991. Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J.* 10 : 885-892
72. Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* 351 : 95-105
73. Winckler T, Zundorf I, Dingermann T. 2008. Protein tyrosine kinases as drug targets. an important group of intracellular regulators. *Pharmazie in unserer Zeit.* 37 : 370-380
74. Kunick C, Egert-Schmidt AM. 2008. The short history of protein kinase inhibitors. new, competitive, successful. *Pharmazie in unserer Zeit.* 37 : 360-368
75. Paradiso A, Mangia A, Azzariti A, Tommasi S. 2007. Phosphatidylinositol 3-kinase in breast cancer: Where from here? *Clin. Cancer Res.* 13 : 5988-5990
76. Toker A, Cantley LC. 1997. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature.* 387 : 673-676
77. Li SY, Rong M, Grier F, Iacopetta B. 2006. PIK3CA mutations in breast cancer are associated with poor outcome. *Breast Cancer Res. Treat.* 96 : 91-95
78. Doan HQ, Bowen KA, Jackson LA, Evers BM. 2009. Toll-like receptor 4 activation increases akt phosphorylation in colon cancer cells. *Anticancer Res.* 29 : 2473-2478
79. He Z, Zhu Y, Jiang H. 2009. Toll-like receptor 4 mediates lipopolysaccharide-induced collagen secretion by phosphoinositide3-kinase-akt pathway in fibroblasts during acute lung injury. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 29 : 119-125
80. Lin WN, Luo SF, Wu CB, Lin CC, Yang CM. 2008. Lipopolysaccharide induces VCAM-1 expression and neutrophil adhesion to human tracheal smooth muscle cells: Involvement of Src/EGFR/PI3-K/Akt pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 228 : 256-268
81. Tak PP, Firestein GS. 2001. NF-kappaB: A key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.* 107 : 7-11

82. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. 1999. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin. Chem.* 45 : 7-17
83. Blaschek W et al. (Hrsg.) 2007. *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*, 6. Auflage. Springer Verlag, Berlin
84. Wichtl M (Hrsg.), 2002. *Teedrogen und Phytopharmaka*, 4. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
85. Teuscher E, Bauermann U, Werner M. 2003. *Gewürzdrogen: Ein Handbuch der Gewürze, Gewürzkräuter, Gewürzmischungen und ihrer ätherischen Öle*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
86. Falch B, Reichling J, Saller R. 1997. Ingwer - nicht nur ein Gewürz. *Dtsch. Apothek. Ztg.* 137 : 4267-4278
87. Heimes K. 2009. *Die antagonistische Wirkung von Zingiber officinale ROSC. und Mentha x piperita L. und einiger ihrer Inhaltsstoffe am 5-HT₃-Rezeptorkanalkomplex: Bedeutung für Antiemesis, Reizdarmsyndromtherapie und Insulinausschüttung*. Dissertationsschrift, Universität Münster
88. Riyazi A. 2006. *Pharmakologische Untersuchungen zum antiemetischen Wirkungsmechanismus des ätherischen Öls von Ingwer (Zingiber officinale ROSCOE)*. Dissertationsschrift, Universität Münster
89. Heimes K, Feistel B, Verspohl EJ. 2009. Impact of the 5-HT₃ receptor channel system for insulin secretion and interaction of ginger extracts. *Eur. J. Pharmacol.* 624 : 58-65
90. Riyazi A, Hensel A, Bauer K, Geissler N, Schaaf S, Verspohl EJ. 2007. The effect of the volatile oil from ginger rhizomes (*Zingiber officinale*), its fractions and isolated compounds on the 5-HT₃ receptor complex and the serotonergic system of the rat ileum. *Planta Med.* 73 : 355-362
91. Abdel-Aziz H, Windeck T, Ploch M, Verspohl EJ. 2006. Mode of action of gingerols and shogaols on 5-HT₃ receptors: Binding studies, cation uptake by the receptor channel and contraction of isolated guinea-pig ileum. *Eur. J. Pharmacol.* 530 : 136-143
92. Levy AS, Simon O, Shelly J, Gardener M. 2006. 6-shogaol reduced chronic inflammatory response in the knees of rats treated with complete freund's adjuvant. *BMC Pharmacol.* 6 : 12
93. Levy AS, Simon OR. 2009. Six-shogaol inhibits production of tumour necrosis factor alpha, interleukin-1 beta and nitric oxide from lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *West Indian Med. J.* 58 : 295-300
94. Tripathi S, Bruch D, Kittur DS. 2008. Ginger extract inhibits LPS induced macrophage activation and function. *BMC Complement. Altern. Med.* 8 : 1
95. Grzanna R, Lindmark L, Frondoza CG. 2005. Ginger--an herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions. *J. Med. Food.* 8 : 125-132
96. Grzanna R, Phan P, Polotsky A, Lindmark L, Frondoza CG. 2004. Ginger extract inhibits beta-amyloid peptide-induced cytokine and chemokine expression in cultured THP-1 monocytes. *J. Altern. Complement. Med.* 10 : 1009-1013

97. Dugasani S, Pichika MR, Nadarajah VD, Balijepalli MK, Tandra S, Korlakunta JN. 2010. Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol. *J. Ethnopharmacol.* 127 : 515-520
98. Kim SO, Kundu JK, Shin YK, Park JH, Cho MH, et al. 2005. 6]-gingerol inhibits COX-2 expression by blocking the activation of p38 MAP kinase and NF-kappaB in phorbol ester-stimulated mouse skin. *Oncogene.* 24 : 2558-2567
99. Ali BH, Blunden G, Tanira MO, Nemmar A. 2008. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* roscoe): A review of recent research. *Food Chem. Toxicol.* 46 : 409-420
100. Srivastava KC, Mustafa T. 1992. Ginger (*Zingiber officinale*) in rheumatism and musculoskeletal disorders. *Med. Hypotheses.* 39 : 342-348
101. Zhou HL, Deng YM, Xie QM. 2006. The modulatory effects of the volatile oil of ginger on the cellular immune response in vitro and in vivo in mice. *J. Ethnopharmacol.* 105 : 301-305
102. Kim JH, Chang JH, Yoon JH, Kwon SH, Bae JH, Kim KS. 2009. 6]-gingerol suppresses interleukin-1 beta-induced MUC5AC gene expression in human airway epithelial cells. *Am. J. Rhinol. Allergy.* 23 : 385-391
103. Ghayur MN, Gilani AH, Janssen LJ. 2008. Ginger attenuates acetylcholine-induced contraction and Ca²⁺ signalling in murine airway smooth muscle cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 86 : 264-271
104. Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K, eds. 2005. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 9. Auflage. Elsevier, München/Jena
105. Furchgott RF, Zawadzki JV. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288 : 373-376
106. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. 1977. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74 : 3203-3207
107. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 333 : 664-666
108. Boger RH. 2003. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res.* 59 : 824-833
109. Green LC, Tannenbaum SR, Goldman P. 1981. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science.* 212 : 56-58
110. Green LC, Ruiz de Luzuriaga K, Wagner DA, Rand W, Istfan N, et al. 1981. Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78 : 7764-7768
111. Stuehr DJ, Marletta MA. 1985. Mammalian nitrate biosynthesis: Mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to escherichia coli lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 82 : 7738-7742
112. Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS. 1988. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: Nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry.* 27 : 8706-8711
113. Palmer RM, Moncada S. 1989. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 158 : 348-352

114. Bush PA, Gonzalez NE, Griscavage JM, Ignarro LJ. 1992. Nitric oxide synthase from cerebellum catalyzes the formation of equimolar quantities of nitric oxide and citrulline from L-arginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185 : 960-966
115. Schmidt HH, Pollock JS, Nakane M, Gorsky LD, Forstermann U, Murad F. 1991. Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 88 : 365-369
116. Kishimoto J, Spurr N, Liao M, Lizhi L, Emson P, Xu W. 1992. Localization of brain nitric oxide synthase (NOS) to human chromosome 12. *Genomics.* 14 : 802-804
117. Nakane M, Mitchell J, Forstermann U, Murad F. 1991. Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180 : 1396-1402
118. Schmidt HH, Gagne GD, Nakane M, Pollock JS, Miller MF, Murad F. 1992. Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. *J. Histochem Cytochem.* 40 : 1439-1456
119. Talman WT, Dragon DN. 2004. Transmission of arterial baroreflex signals depends on neuronal nitric oxide synthase. *Hypertension.* 43 : 820-824
120. Myslivecek J, Hassmannova J, Barcal J, Safanda J, Zalud V. 1996. Inhibitory learning and memory in newborn rats influenced by nitric oxide. *Neuroscience.* 71 : 299-312
121. Holscher C, McGlinchey L, Anwyl R, Rowan MJ. 1996. 7-nitro indazole, a selective neuronal nitric oxide synthase inhibitor in vivo, impairs spatial learning in the rat. *Learn Mem.* 2 : 267-278
122. Jing L, Inoue R, Tashiro K, Takahashi S, Ito Y. 1995. Role of nitric oxide in non-adrenergic, non-cholinergic relaxation and modulation of excitatory neuroeffector transmission in the cat airway. *J. Physiol.* 483 (Pt 1) : 225-237
123. Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, Nishida K, Murphy TJ, et al. 1995. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am. J. Physiol.* 269 : C1371-1378
124. Pollock JS, Nakane M, Buttery LD, Martinez A, Springall D, et al. 1993. Characterization and localization of endothelial nitric oxide synthase using specific monoclonal antibodies. *Am. J. Physiol.* 265 : C1379-1387
125. Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, et al. 1994. Nitric oxide synthase isozymes. characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension.* 23 : 1121-1131
126. Jain B, Rubinstein I, Robbins RA, Leise KL, Sisson JH. 1993. Modulation of airway epithelial cell ciliary beat frequency by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191 : 83-88
127. Runer T, Cervin A, Lindberg S, Uddman R. 1998. Nitric oxide is a regulator of mucociliary activity in the upper respiratory tract. *Otolaryngol. Head. Neck. Surg.* 119 : 278-287
128. Belvisi MG, Stretton CD, Yacoub M, Barnes PJ. 1992. Nitric oxide is the endogenous neurotransmitter of bronchodilator nerves in humans. *Eur. J. Pharmacol.* 210 : 221-222

129. Barnes PJ, Belvisi MG. 1993. Nitric oxide and lung disease. *Thorax*. 48 : 1034-1043
130. Alberty J, Stoll W, Rudack C. 2006. The effect of endogenous nitric oxide on mechanical ciliostimulation of human nasal mucosa. *Clin. Exp. Allergy*. 36 : 1254-1259
131. Shaul PW. 2002. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: Location, location, location. *Annu. Rev. Physiol*. 64 : 749-774
132. Gratiou C, Lignos M, Dassiou M, Roussos C. 1999. Influence of atopy on exhaled nitric oxide in patients with stable asthma and rhinitis. *Eur. Respir. J*. 14 : 897-901
133. Storm van's Gravesande K, Wechsler ME, Grasemann H, Silverman ES, Le L, et al. 2003. Association of a missense mutation in the NOS3 gene with exhaled nitric oxide levels. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 168 : 228-231
134. Rodway GW, Choi J, Hoffman LA, Sethi JM. 2009. Exhaled nitric oxide in the diagnosis and management of asthma: Clinical implications. *Chron. Respir. Dis*. 6 : 19-29
135. Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. 2004. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol. Rev*. 84 : 731-765
136. Pepke-Zaba J, Higenbottam TW, Dinh-Xuan AT, Stone D, Wallwork J. 1991. Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. *Lancet*. 338 : 1173-1174
137. Krishna MT, Chauhan AJ, Frew AJ, Holgate ST. 1998. Toxicological mechanisms underlying oxidant pollutant-induced airway injury. *Rev. Environ. Health*. 13 : 59-71
138. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. 1992. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*. 339: 572-575
139. Cooke JP. 2005. ADMA: Its role in vascular disease. *Vasc Med*. 10 Suppl 1 : S11-7
140. Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, et al. 2003. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 23 : 1455-1459
141. Boger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, et al. 2000. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: Involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ. Res*. 87 : 99-105
142. Boger RH, Bode-Boger SM, Tsao PS, Lin PS, Chan JR, Cooke JP. 2000. An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes. *J. Am. Coll. Cardiol*. 36 : 2287-2295
143. Ueda S, Yamagishi S, Matsumoto Y, Fukami K, Okuda S. 2007. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) is a novel emerging risk factor for cardiovascular disease and the development of renal injury in chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol*. 11 : 115-121
144. Chen MF, Xie XM, Yang TL, Wang YJ, Zhang XH, et al. 2007. Role of asymmetric dimethylarginine in inflammatory reactions by angiotensin II. *J. Vasc. Res*. 44 : 391-402

145. Wells SM, Holian A. 2007. Asymmetric dimethylarginine induces oxidative and nitrosative stress in murine lung epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 36 : 520-528
146. Wells SM, Buford MC, Migliaccio CT, Holian A. 2009. Elevated asymmetric dimethylarginine alters lung function and induces collagen deposition in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 40 : 179-188
147. Alberty J, August C, Stoll W, Rudack C. 2004. The effect of endogenous nitric oxide on cholinergic ciliary stimulation of human nasal mucosa. *Laryngoscope.* 114 : 1642-1647
148. Veresh Z, Racz A, Lotz G, Koller A. 2008. ADMA impairs nitric oxide-mediated arteriolar function due to increased superoxide production by angiotensin II-NAD(P)H oxidase pathway. *Hypertension.* 52 : 960-966
149. Reddel RR, Ke Y, Gerwin BI, McMenamin MG, Lechner JF, et al. 1988. Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res.* 48 : 1904-1909
150. Kinnula VL, Yankaskas JR, Chang L, Virtanen I, Linnala A, et al. 1994. Primary and immortalized (BEAS 2B) human bronchial epithelial cells have significant antioxidative capacity in vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 11 : 568-576
151. Nilsson K, Sundstrom C. 1974. Establishment and characteristics of two unique cell lines from patients with lymphosarcoma. *Int. J. Cancer.* 13 : 808-823
152. Atsumi Y, Dodd RC, Maddux FW, Citron SJ, Gray TK. 1986. Retinoids induce U937 cells to express macrophage phenotype. *Am. J. Med. Sci.* 292 : 152-156
153. Ho CK. 1985. Synergistic anticellular effect of a combination of beta-interferon and retinoic acid against U937 cells. *Cancer Res.* 45 : 5348-5351
154. Tanaka H, Abe E, Miyaura C, Shiina Y, Suda T. 1983. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 induces differentiation of human promyelocytic leukemia cells (HL-60) into monocyte-macrophages, but not into granulocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117 : 86-92
155. Moscicki RA, Amento EP, Krane SM, Kurnick JT, Colvin RB. 1983. Modulation of surface antigens of a human monocyte cell line, U937, during incubation with T lymphocyte-conditioned medium: Detection of T4 antigen and its presence on normal blood monocytes. *J. Immunol.* 131 : 743-748
156. Chen AC, Donovan SM. 2004. Genistein at a concentration present in soy infant formula inhibits caco-2BBE cell proliferation by causing G2/M cell cycle arrest. *J. Nutr.* 134 : 1303-1308
157. Johansson AS, Liden J, Okret S, Palmblad JE. 2005. Effects of ethanol on cytokine generation and NF-kappaB activity in human lung epithelial cell. *Biochem. Pharmacol.* 70 : 545-551
158. Jonsson AS, Palmblad JE. 2001. Effects of ethanol on NF-kappaB activation, production of myeloid growth factors, and adhesive events in human endothelial cells. *J. Infect. Dis.* 184 : 761-769

159. Johansson AS, Johansson-Haque K, Okret S, Palmblad J. 2008. Ethyl pyruvate modulates acute inflammatory reactions in human endothelial cells in relation to the NF-kappaB pathway. *Br. J. Pharmacol.* 154 : 1318-1326
160. Bhattacharyya S, Dudeja PK, Tobacman JK. 2008. Lipopolysaccharide activates NF-kappaB by TLR4-Bcl10-dependent and independent pathways in colonic epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 295 : G784-790
161. Veronesi B, Carter JD, Devlin RB, Simon SA, Oortgiesen M. 1999. Neuropeptides and capsaicin stimulate the release of inflammatory cytokines in a human bronchial epithelial cell line. *Neuropeptides.* 33 : 447-456
162. Drumm K, Attia DI, Kannt S, Micke P, Buhl R, Kienast K. 2000. Soot-exposed mononuclear cells increase inflammatory cytokine mRNA expression and protein secretion in cocultured bronchial epithelial cells. *Respiration.* 67 : 291-297
163. Heo SK, Yun HJ, Noh EK, Park WH, Park SD. 2008. LPS induces inflammatory responses in human aortic vascular smooth muscle cells via toll-like receptor 4 expression and nitric oxide production. *Immunol. Lett.* 120 : 57-64
164. Ueda S, Kato S, Matsuoka H, Kimoto M, Okuda S, et al. 2003. Regulation of cytokine-induced nitric oxide synthesis by asymmetric dimethylarginine: Role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circ. Res.* 92 : 226-233
165. Rosbe KW, Mims JW, Prazma J, Petrusz P, Rose A, Drake AF. 1996. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase activity in upper respiratory epithelium. *Laryngoscope.* 106 : 1075-1079
166. Ito A, Egashira K, Narishige T, Muramatsu K, Takeshita A. 2001. Renin-angiotensin system is involved in the mechanism of increased serum asymmetric dimethylarginine in essential hypertension. *Jpn. Circ. J.* 65 : 775-778
167. Arora S, Vohra P, Kumar A, Tyagi YK, Raj HG, et al. 2008. Calreticulin transacetylase catalyzed activation of rat tracheal smooth muscle cell nitric oxide synthase by acetoxycoumarins. *Biol. Pharm. Bull.* 31 : 709-713
168. Fearn C, Kravchenko VV, Ulevitch RJ, Loskutoff DJ. 1995. Murine CD14 gene expression in vivo: Extramyeloid synthesis and regulation by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 181 : 857-866
169. Cohen L, E X, Tarsi J, Ramkumar T, Horiuchi TK, et al. 2007. Epithelial cell proliferation contributes to airway remodeling in severe asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 176 : 1381-45
170. Ricciardolo FL, Di Stefano A, van Krieken JH, Sont JK, van Schadewijk A, et al. 2003. Proliferation and inflammation in bronchial epithelium after allergen in atopic asthmatics. *Clin. Exp. Allergy.* 33 : 905-911
171. Freitag A, Reimann A, Wessler I, Racke K. 1996. Effects of bacterial lipopolysaccharides (LPS) and tumour necrosis factor-alpha (TNF alpha) on rat tracheal epithelial cells in culture: Morphology, proliferation and induction of nitric oxide (NO) synthase. *Pulm. Pharmacol.* 9 : 149-156
172. Preciado D, Caicedo E, Jhanjee R, Silver R, Harris G, et al. 2005. Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide induction of keratinocyte proliferation, NF-kappa B, and cyclin D1 is inhibited by indomethacin. *J. Immunol.* 174 : 2964-2973

173. Tesfaigzi Y, Harris JF, Hotchkiss JA, Harkema JR. 2004. DNA synthesis and bcl-2 expression during development of mucous cell metaplasia in airway epithelium of rats exposed to LPS. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 286 : L268-274
174. Pera T, Gosens R, Lesterhuis AH, Sami R, Toorn M, et al. 2010. Cigarette smoke and lipopolysaccharide induce a proliferative airway smooth muscle phenotype. *Respir. Res.* 11 : 48
175. Park J, Gores GJ, Patel T. 1999. Lipopolysaccharide induces cholangiocyte proliferation via an interleukin-6-mediated activation of p44/p42 mitogen-activated protein kinase. *Hepatology.* 29 : 1037-1043
176. Takami K, Takuwa N, Okazaki H, Kobayashi M, Ohtoshi T, et al. 2002. Interferon-gamma inhibits hepatocyte growth factor-stimulated cell proliferation of human bronchial epithelial cells: Upregulation of p27(kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26 : 231-238
177. Mollerup S, Jorgensen K, Berge G, Haugen A. 2002. Expression of estrogen receptors alpha and beta in human lung tissue and cell lines. *Lung Cancer.* 37 : 153-159
178. Taioli E, Wynder EL. 1994. Re: Endocrine factors and adenocarcinoma of the lung in women. *J. Natl. Cancer Inst.* 86 : 869-870
179. Osterlund C, Gronlund H, Polovic N, Sundstrom S, Gafvelin G, Bucht A. 2009. The non-proteolytic house dust mite allergen der p 2 induce NF-kappaB and MAPK dependent activation of bronchial epithelial cells. *Clin. Exp. Allergy.* 39 : 1199-1208
180. Wang S, Prophete C, Soukup JM, Chen LC, Costa M, et al. 2010. Roles of MAPK pathway activation during cytokine induction in BEAS-2B cells exposed to fine world trade center (WTC) dust. *J. Immunotoxicol.*
181. Zietkowski Z, Bodzenta-Lukaszyc A, Tomasiak MM, Skiepkowski R, Mroczko B, Szmitkowski M. 2009. Changes in RANTES and beta-thromboglobulin after intensive exercise in patients with allergic asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 148 : 31-40
182. Koyama S, Sato E, Nomura H, Kubo K, Miura M, et al. 2000. The potential of various lipopolysaccharides to release IL-8 and G-CSF. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 278 : L658-666
183. Kresken M, Stahlmann R, Lode H. 2008. Pseudomonas aeruginosa. *Zeitschrift für Chemotherapie.* 29 : 23
184. Bocker U, Yezersky O, Feick P, Manigold T, Panja A, et al. 2003. Responsiveness of intestinal epithelial cell lines to lipopolysaccharide is correlated with toll-like receptor 4 but not toll-like receptor 2 or CD14 expression. *Int. J. Colorectal Dis.* 18 : 25-32
185. Park EJ, Yi J, Chung KH, Ryu DY, Choi J, Park K. 2008. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol. Lett.* 180 : 222-229
186. Regamey N, Obregon C, Ferrari-Lacraz S, van Leer C, Chanson M, et al. 2007. Airway epithelial IL-15 transforms monocytes into dendritic cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 37 : 75-84

187. Oberg F, Botling J, Nilsson K. 1993. Functional antagonism between vitamin D3 and retinoic acid in the regulation of CD14 and CD23 expression during monocytic differentiation of U-937 cells. *J. Immunol.* 150 : 3487-3495
188. Aimbire F, Penna SC, Rodrigues M, Rodrigues KC, Lopes-Martins RA, Sertie JA. 2007. Effect of hydroalcoholic extract of zingiber officinalis rhizomes on LPS-induced rat airway hyperreactivity and lung inflammation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 77 : 129-138
189. Jones E, Adcock IM, Ahmed BY, Panchard NA. 2007. Modulation of LPS stimulated NF-kappaB mediated nitric oxide production by PKCepsilon and JAK2 in RAW macrophages. *J. Inflamm.* 4 : 23
190. Yang ZC, Wang KS, Wu Y, Zou XQ, Xiang YY, et al. 2009. Asymmetric dimethylarginine impairs glucose utilization via ROS/TLR4 pathway in adipocytes: An effect prevented by vitamin E. *Cell. Physiol. Biochem.* 24 : 115-124
191. Chen M, Li Y, Yang T, Wang Y, Bai Y, Xie X. 2008. ADMA induces monocyte adhesion via activation of chemokine receptors in cultured THP-1 cells. *Cytokine.* 43 : 149-159
192. Watkins DN, Peroni DJ, Basclain KA, Garlepp MJ, Thompson PJ. 1997. Expression and activity of nitric oxide synthases in human airway epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 16 : 629-639
193. Uetani K, Arroliga ME, Erzurum SC. 2001. Double-stranded RNA dependence of nitric oxide synthase 2 expression in human bronchial epithelial cell lines BET-1A and BEAS-2B. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 24 : 720-726
194. Asano K, Chee CB, Gaston B, Lilly CM, Gerard C, et al. 1994. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 : 10089-10093
195. Chen MF, Li YJ, Yang TL, Lou B, Xie XM. 2009. Losartan inhibits monocytic adhesion induced by ADMA via downregulation of chemokine receptors in monocytes. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 65 : 457-464
196. Saridogan E, Djahanbakhch O, Puddefoot JR, Demetroulis C, Collingwood K, et al. 1996. Angiotensin II receptors and angiotensin II stimulation of ciliary activity in human fallopian tube. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81 : 2719-2725
197. Antosova M, Strapkova A, Nosal'ova G, Mokry J. 2006. Effect of nitric oxide synthases inhibitors on exogenous irritant-induced bronchial hyper-reactivity in guinea pigs. *Gen. Physiol. Biophys.* 25 : 137-147

Danksagung

Zunächst danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Eugen J. Verspohl für die freundliche und unkomplizierte Betreuung sowie für sein Verständnis in Zeiten, in denen die Promotion auf der Prioritätenliste ganz weit nach unten rutschte.

Prof. Dr. Hensel danke ich für seine Unterstützung und seine Mühe bei der Erstellung des Zweitgutachtens für diese Arbeit.

Dr. Jörg Fabian aus dem Arbeitskreis Prof. Lehr möchte ich für seine freundliche Hilfe bei der HPLC danken. Dr. Mathias Jacob und Marei Hoffmann vom Institut für Pharmazeutische Biologie und Phytochemie haben mir bei der Durchführung der FACS-Analysen sehr geholfen. Danke dafür!

Meine Wahlpflichtfachstudentinnen Theresa Schlottbom, Vanessa Voss und Meike Hoffmann haben mich während ihres Praktikums tatkräftig unterstützt und unermüdlich ELISAs durchgeführt, ohne sich zu beschweren – auch ihnen möchte ich herzlich danken.

Meinem Arbeitskreis danke ich für die Unterstützung und Anregung bei der Arbeit, aber noch viel mehr für die anderen wichtigen Sachen, durch die ich die Promotionszeit immer in schöner Erinnerung behalten werde. Jonas danke ich außerdem herzlich für's Korrekturlesen.

Herbert habe ich es – neben vielem anderen – zu verdanken, dass ich mich in der Endphase der Promotion nicht in ungesundem Maße mit der Schreiberei beschäftigt habe.

Nicht zuletzt danke ich Papa, Johannes und besonders Mama für ihre liebevolle Unterstützung. Ohne dich wäre ich nie auf die Idee gekommen, Apothekerin zu werden. Aber was viel wichtiger ist: Durch alles, was wir zusammen durchstehen mussten, habe ich gelernt, dass Arbeit und Erfolg im Leben niemals das Wichtigste sein können.

